

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
E ENGENHARIA DE MATERIAIS – P²CEM

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE UM AGENTE MODIFICADOR
DE SUPERFÍCIE DE PARTÍCULAS NA ESTRUTURAÇÃO DE
COMPÓSITOS BIOATIVOS

por

JOYCE KELLY MARINHEIRO DA CUNHA GONSALVES

Universidade Federal de Sergipe
Cidade Universitária “Prof. José Aloísio de Campos”
São Cristóvão – Sergipe – Brasil

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE UM AGENTE MODIFICADOR DE SUPERFÍCIE DE PARTICULAS NA ESTRUTURAÇÃO DE COMPÓSITOS BIOATIVOS

JOYCE KELLY MARINHEIRO DA CUNHA GONSALVES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Sergipe, como um dos requisitos para a obtenção do título de Doutor (a) em Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientador:

Prof. Dr. Mário Ernesto Giroldo Valério

Co-orientador/Colaborador (a):

Prof. Dra. Rogéria de Souza Nunes

**SÃO CRISTÓVÃO-SE
DEZEMBRO/2016**

"Avaliação da Influência de um Agente Modificador de Superfície de
Partículas na Estruturação de Compósitos Bioativos".

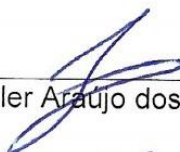
Joyce Kelly Marinheiro da Cunha Gonsalves

Tese submetida ao corpo docente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS da Universidade Federal de Sergipe
como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de DOUTOR em
CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS.

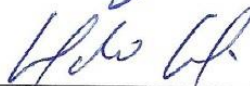
Aprovada por:



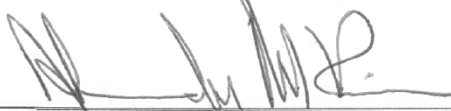
Prof. Dr. Mario Ernesto Giroldo Valerio



Prof. Dr. Euler Araújo dos Santos



Prof. Dr. Marcelo Massayoshi Ueki



Prof. Dr. Alexandre Malta Rossi



Prof. Dr. Victor Hugo Vitorino Sarmento

SÃO CRISTÓVÃO, SE – BRASIL.

Dezembro/2016

*“Andei pra chegar tão longe
Daqui de longe eu olhei pra trás
E foi como ver distante
Eu atravessando os meus temporais”*

(Lenine)

AGRADECIMENTOS

“Sozinho. Totalmente sozinho. Ninguém consegue sobreviver sozinho.”

Maya Angels

Nada mais justo do que agradecer aqueles que se fizeram presentes nestes quatro longos anos de doutorado. Pois nunca estive só ...

Deus: meu refúgio, meu consolo, minha salvação, fortaleceu-me para que o tão almejado dia chegasse... Obrigada pela presença constante em minha vida.

Minha querida mãe, Nossa Senhora, que sempre intercedeu por mim. Obrigada!!

Aos meus pais, Josefa e Jair. Por vocês cheguei até aqui... pelo companheirismo, pela dedicação infinita, pela confiança. Nada será o bastante para retribuí-los. Aos meus familiares, em especial a minha avó Eremita, a minha irmã Jessyca e a meu afilhado, Gustavo.

A meu orientador, professor Dr. Mario Valerio. Obrigada pela confiança, dedicação, oportunidade, incentivo, apoio e sobre tudo, orientação. Foi um grande desafio para ambos, certamente. Mas sem sua generosidade em aceitar-me como aluna, nada disso teria se concretizado. Sou imensamente grata!!!

A minha co-orientadora e principal colaboradora do trabalho, professora Dra. Rogéria de Souza Nunes, pela dedicação, paciência, suporte e orientação. Muito obrigada!!!

A CAPES e a FAPITEC, o apoio financeiro concedido.

Aos professores Dr. Victor Sarmiento, Dr. Eduardo Miqueles, Dra. Nathaly Lopes, Dr. Emiliano Barreto e Dr. Thiago Remacre, agradeço a colaboração nos nossos projetos e disposição a contribuir com conhecimentos.

Aos membros da banca da tese e das disciplinas de pesquisa, pelas contribuições dadas ao trabalho e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (P²CEM).

A todos que fizeram e fazem parte do LPCM – NUPEG, em especial a Felipe, Verônica, Janaína, Claudiane, Camila, Jéssica, Giordano, Adriano, e professora Dra. Zélia. Acolheram-me como novo membro do grupo. Obrigada de coração!

A todos que fizeram e fazem parte do LADEF - DFA, onde conheci grandes amigos e que desde 2007 acompanham-me. Em particular, a Raquel, Juliana, Gabriela, Raíssa, Dill, Adriana e Glauci por tornarem meus dias mais leves.

Aos técnicos e alunos pelas colaborações na execução de medidas: Adriana, Cochiran, Cláudia, Jamylle (UFAL), Alyne, Luiz.

Aos meus amigos de faculdade, e aos amigos que construí no P²CEM: Jamilly, Ivory, Genelane.

Agradeço também os centros de pesquisa CMNano-UFS, LNLS, DQI-ITA, DQI-SC, DFI, LBM-UFAL pela contribuição em análises importantes a conclusão do trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento da tese.

Muito obrigada!

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

G635a Gonsalves, Joyce Kelly Marinheiro da Cunha
Avaliação da influência de um agente modificador de
superfície de partículas na estruturação de compósitos
bioativos / Joyce Kelly Marinheiro da Cunha Gonsalves;
orientador Mário Ernesto Giroldo Valério. – São Cristóvão,
2016.
159 f.: il.

Tese (doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) –
Universidade Federal de Sergipe, 2016.

1. Engenharia de materiais. 2. Materiais biomédicos. 3.
Hidroxiapatita. 4. Nanocompósitos (Materiais). I. Valério, Mário
Ernesto Giroldo, orient. II. Título.

CDU 620:616-77

RESUMO

Tratar lesões em tecidos vivos tornou-se uma problemática em saúde devido ao tardio processo de cicatrização natural, a uma limitada aceitação e compatibilidade com enxertos. O desenvolvimento de biomateriais surge como nova estratégia. Deste modo, este trabalho teve como objetivo principal a obtenção de compósitos bioativos porosos e avaliar a influência da composição nas características físicas, químicas, estruturais, morfológicas e biológicas para uma possível aplicação em tecido ósseo. A proposta iniciou-se com a obtenção e caracterização de nanopartículas de hidroxiapatita (HAP) (precipitação por via úmida) e com a modificação de sua superfície pelo ácido esteárico (AE) (refluxo). A presença do AE sob a superfície da HAP promoveu alterações significativas em suas características gerais, principalmente em suas morfologias, tamanhos e estabilidade térmica (TG/DTG). Para os compósitos, quitosanas com diferentes graus de pureza foram escolhidas. Com o intuito de homogeneizar a cerâmica sob a dispersão polimérica, fez necessária a incorporação de um agente de viscosidade, o hidroxietilcelulose (HEC). Sendo assim, seis grupos de compósitos foram avaliados e caracterizados por técnicas que permitiram inferir informações básicas a respeito do grau de intumescimento, da porosidade, da morfologia de superfície, da estabilidade térmica, da cristalinidade e do ambiente químico. A viabilidade celular avaliada sob os compósitos permitiu sugerir a biocompatibilidade destes. O estudo da organização estrutural durante a liofilização, utilizando-se o espalhamento de raios X a baixos ângulos, e a avaliação da estrutura morfológica interna dos compósitos sob influência da composição foi realizada através da tomografia de raios X. Tais análises permitiram inferir que a presença do AE na composição de superfície das nanopartículas inseridas nos compósitos influenciou na aglomeração e deposição das nanocargas de HAP sob a estrutura polimérica, determinando as características estruturais destes compósitos.

PALAVRAS-CHAVES: arcabouços, modificador de superfície, hidroxiapatita, compósitos bioativos

ABSTRACT

Treating lesions in living tissues has become a health issue due to the late natural healing process, limited acceptance and compatibility with grafts. The development of biomaterials emerges as a new strategy. Thus, this study aimed to obtain bioactive porous composite, of different compositions and the evaluation of the influence of the composition on the physical, chemical, structural, morphological and biological properties for possible application in tissue engineering. The project started with the preparation and characterization of hydroxyapatite nanoparticles (HAP), via a wet precipitation route, and the modification of their surface by stearic acid (SA) (reflux). The presence of SA in the surface of HAP promoted significant changes in their general characteristics, especially in their morphology, size and thermal stability (TG/DTG). For the formation of composites, chitosan with different degrees of purity were chosen. To the homogeneous dispersion of ceramic in the polymer dispersion has required the incorporation of a viscosity agent, hydroxyethyl cellulose (HEC), which prevented the settling of HAP particles. Thus, six groups were evaluated and characterized by techniques that allowed to infer basic information about the degree of swelling, porosity, surface morphology, thermal stability, crystallinity and chemical environment (chemical groups). The cellular viability evaluated under the composites allows suggesting the biocompatibility of these. The study of the structural organization during lyophilization, using the small angle X-ray scattering, and evaluation of internal morphological structure of the composites under the influence of the composition was performed using X-ray Tomography. These analyzes showed that the presence of SA in the surface composition of nanoparticles inserted in composites influenced the agglomeration and deposition of HAP nanometric in the polymer structure, determining the structural characteristics of these composites.

KEY WORDS: Scaffolds, surface modifier, hydroxyapatite, bioactive composites

LISTA DE TABELAS

Tabela II.1. Estruturas micrométricas de arcabouços e suas características definidas por FU, SAINZ, <i>et al.</i> , (2013).	32
Tabela II.2. Tipos de fosfato de cálcio e suas razões Ca/P.	40
Tabela III.1. Compósitos inorgânico/orgânico (66/34 p/p): composição dos compósitos na presença do HEC.	71
Tabela IV.1. Comprimentos de onda característicos da HAP-P, HAP-M7, HAP-M15 e do AE.	93
Tabela IV.2. Comprimentos de onda característicos das hidroxiapatitas e dos compósitos.	100
Tabela IV.3. Valores de perdas de massa e faixas de temperatura em que ocorreram para cada compósito.	109
Tabela IV.4. Parâmetros de massa e superfície fractal dos arcabouços.	131

LISTA DE FIGURAS

Figura I.1. Biocerâmica OSTEOSYNT® e suas diferentes apresentações.	22
Figura II.1. Divisão das escalas estruturais do tecido ósseo.	26
Figura II.2. Tecido ósseo e sua organização estrutural e hierárquica.	28
Figura II.3. Imagens representativas de arcabouços 3D formados por diferentes técnicas: (a) Isotropia; (b) Anisotropia, e (c) Periodicidade.	33
Figura II.4. Representação esquemática da estrutura química da quitosana.	36
Figura II.5. Representação esquemática da estrutura química do hidroxietilcelulose. ..	38
Figura II.6. Representação esquemática da estrutura química da hidroxiapatita.	42
Figura II.7. Representação esquemática da interação química na quitosana para a formação do hidrogel, enfoque (seta) para as interações.	59
Figura II.8. Registro do espalhamento do feixe de raios X por um detector.	62
Figura II.9. Gráfico típico de espalhamento de raios X a baixos ângulos.	63
Figura II.10. Produção de imagens por tomografia de raios X.	67
Figura II.11. Redução do agente MTT a azul de Formazan.	69
Figura IV.1. Curva de titulação condutimétrica característica de uma amostra de QAP e de QBP.	81
Figura IV.2. Histograma de distribuição de tamanho de partícula em função do número (%) em função do tamanho: (a) HAP-P, (b) HAP-M7 e (c) HAP-M15.	83
Figura IV.3. Histograma de distribuição de tamanho de partícula em função da intensidade de espalhamento (%): (a) HAP-P, (b) HAP-M7 e (c) HAP-M15.	85
Figura IV.4. Equação global de esterificação da HAP com o AE.	86
Figura IV.5. Difratoograma de raios X das hidroxiapatitas, do AE e do padrão.	88
Figura IV.6. Difratoograma de raios X dos compósitos de QAP e do padrão cristalográfico da HAP.	90
Figura IV.7. Difratoograma de raios X dos compósitos de QBP e do padrão cristalográfico da HAP.	90

Figura IV.8. Espectros de absorção na região do infravermelho para as hidroxiapatita (HAP-P, HAP-M7 e HAP-M15) e AE.	92
Figura IV.9. Espectros de absorção na região do infravermelho para QAP, QBP e HEC.	94
Figura IV.10. (a) Espectros de absorção no infravermelho dos compósitos GI, GIII e GV, constituídas de QAP, HEC e hidroxiapatita com e sem modificação de superfície; (b) Espectros ampliados na região entre 2000 a 400 cm ⁻¹	95
Figura IV.11. (a) Espectros de absorção no infravermelho dos compósitos GII, GIV e GVI, constituídas de QBP, HEC e hidroxiapatita com e sem modificação de superfície; (b) Espectros ampliados na região entre 2000 a 400 cm ⁻¹	96
Figura IV.12. Curvas de TG e DTG para a HAP-P, HAP-M15 e HAP-M7, obtidas na razão de aquecimento de 10°C/min em atmosfera de argônio, fluxo de gás de 60 mL/min.	102
Figura IV.13. Curvas de TG e DTG para o ácido esteárico (AE), obtidas na razão de aquecimento de 10°C/min em atmosfera de argônio, fluxo de gás de 60 mL/min.	103
Figura IV.14. Curvas de TG e DTG para a QAP, QBP e HEC, obtidas na razão de aquecimento de 10°C/min em atmosfera de argônio, fluxo de gás de 60 mL/min.	106
Figura IV.15. Curvas de TG e DTG para o GI, GIII e GV, obtidas na razão de aquecimento de 10°C/min em atmosfera de argônio, fluxo de gás de 60 mL/min.	107
Figura IV.16. Curvas de TG e DTG para o GII, GIV e GVI, obtidas na razão de aquecimento de 10°C/min em atmosfera de argônio, fluxo de gás de 60 mL/min.	108
Figura IV.17. Gráfico da porosidade dos diferentes compósitos.	111
Figura IV.18. Perfil de intumescimento dos arcabouços de polímeros e dos compósitos após 24 horas e em tampão fosfato pH 7,4 a 37°C.	113
Figura IV.19. Micrografias de MEV da (a) HAP-P; (b) HAP-M7 e (c) HAP-M15.	119
Figura IV.20. Imagens de MEV do compósito GI: (a) poros abertos e (b) poros abertos e interconectados.	121

Figura IV.21. Compósito GI: (a) imagem de MEV, (b) gráfico de EDS, (c) e (d) mapa de distribuição dos elementos Ca e P.	122
Figura IV.22. Imagens de MEV do compósito GI (a, d, g, j), GIII (b, e, h, k) e GV (c, f, i, m).	126
Figura IV.23. Curvas de SAXS para os compósitos e sua matriz polimérica durante 10 min de liofilização (t=1s e t=10min).	128
Figura IV.24. Curvas de SAXS para os arcabouços dos compósitos e sua matriz polimérica.	130
Figura IV.25. Imagens de tomografia de raios X do arcabouço polimérico (QS+HEC): (a) seção completa, (b) projeção xy, (c) projeção xz, (d) projeção yz, (e) e (f) projeções com maiores ampliações.	134
Figura IV.26. Imagens de tomografia de raios X do arcabouço GI: (a) seção completa, (b) projeção xy, (c) projeção xz, (d) projeção yz, (e) e (f) projeções com maiores ampliações.	135
Figura IV.27. Imagens de tomografia de raios X do arcabouço GIII: (a) seção completa, (b) projeção xy, (c) projeção xz, (d) projeção yz, (e) e (f) projeções com maiores ampliações.	136
Figura IV.28. Imagens de tomografia de raios X do arcabouço GV: (a) seção completa, (b) projeção xy, (c) projeção xz, (d) projeção yz, (e) e (f) projeções com maiores ampliações.	137
Figura IV.29. Efeito dos compósitos na viabilidade dos macrófagos usando o ensaio de MTT. As células foram tratadas com os compósitos (10 e 100 µg/mL) e expostas por 3 horas. Os dados foram expressos como % de células viáveis em comparação com o veículo e foram expressos com média e desvio padrão médio. Controle Positivo – células expostas ao meio de cultura (100% de viabilidade) e Controle Negativo – células expostas a 3% de Tween 20 (43,54% ± 3,90).	140

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação II.1. Equação que expressa a relação Stokes-Einstein.	51
Equação II.2. Equação que representa a Lei de Bragg.	52
Equação II.3. Equação da intensidade resultante das contribuições das partículas no SAXS.	63
Equação II.4. Equação para a determinação do vetor de espalhamento descrito em função do fator de estrutura ($S(q)$).	64
Equação III.1. Cálculo da densidade real do compósito.	75
Equação III.2. Cálculo da densidade teórica do compósito.	75
Equação III.3. Cálculo da densidade relativa do compósito.	75
Equação III.4. Cálculo da porosidade do compósito.	75
Equação III.5. Equação para a determinação do grau de intumescimento dos compósitos.	76
Equação IV.1. Equação para determinar o grau de desacetilação (GD) das quitosanas.	80

ABREVIATURAS

HAP: hidroxiapatita

QAP: quitosana de alta pureza

QBP: quitosana de baixa pureza

AE: ácido esteárico

°C: grau Celsius

%: porcentagem

W%: porcentagem de intumescimento

TG/DTG: termogravimetria e primeira derivada da termogravimetria

IVTF: Infravermelho com Transformada de Fourier

DRX: difratometria de raios X

MEV: microscopia eletrônica de varredura

SAXS: espalhamento de raios X a baixos ângulos

GD: grau de desacetilação

Ca/P: razão molar entre os átomos de cálcio e fósforo

Mg²⁺: íon de magnésio

Sr²⁺: íon de estrôncio

Fe²⁺: íon de ferro

Pb²⁺: íon de chumbo

Na⁺: íon de sódio

K⁺: íon de potássio

F: flúor

CO₃²⁻: ânion de carbonato

HPO₄²⁻: hidrogeno fosfato

H₂PO₄⁻: dihidrogenofosfato

TCP: fosfato de tri cálcio

HEC: hidroxietilcelulose

PO₄³⁻: íon fosfato

HAP: hidroxiapatita

HAP-M: hidroxiapatita com a superfície modificada

HAP-M7: hidroxiapatita com a superfície modificada com 7% de AE

HAP-M15: hidroxiapatita com a superfície modificada com 15% de AE

EDL: espalhamento dinâmico de luz

mL: mililitro

min: minutos

nm: nanômetro

D : coeficiente de difusão

K : constante de Boltzmann

T : temperatura

η : viscosidade

R_h : raio hidrodinâmico da partícula

HAP-P: hidroxiapatita sem modificação de superfície

mW: miliwatt

λ : comprimento de onda

He-Ne: hélio-neônio

mg: miligrama

W: watt

AP: alta pureza

BP: baixa pureza

NaOH: hidróxido de sódio

HCl: ácido clorídrico

pH:

pKa:

p/v: peso/volume

v/v: volume/volume

GI: Grupo I

GII: Grupo II

GIII: Grupo III

GIV: Grupo IV

GV: Grupo V

GVI: Grupo VI

d : distância entre os planos
 n : ordem de difração
 θ : ângulo de incidência do feixe
kV: quilovolt
mA: miliangstron
mm: milímetro
°/min: grau por minuto
CoK α : radiação característica do cobalto
NL₂: nitrogênio líquido
 M_i : massa do compósito após à imersão
 M_s : massa do compósito seco
g/m²: grama por metro ao quadrado
cm²: centímetros quadrados
cm³: centímetros cúbicos
%W: porcentagem de intumescimento
EDS: espectroscopia de energia dispersiva
FEG-SEM: Field emission gun – scanning electronic microscope
SBF: fluido corpóreo simulado
MTT: (3- (4,5- dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio)
 $I(q)$: intensidade do feixe espalhado
 $P(q)$: forma da partícula
 q : o vetor de espalhamento
 $S(q)$: fator estrutura
MM: massa molecular
R_g: raio de giro
CCD: charge-coupled device Camera
TCRS: tomografia de raios x utilizando fontes de radiação sincrotron

SUMÁRIO

Resumo	viii
Abstract	ix
Lista de Tabelas	x
Lista de Figuras	xi
Lista de Equações	xiv
Abreviaturas	xv
I. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	21
<i>I.1. Considerações Iniciais</i>	21
<i>I.2. Objetivos</i>	24
II. REVISÃO DA LITERATURA	26
<i>II.1. Tecido Ósseo</i>	26
<i>II.2. Arcabouços 3D: Biomateriais para reparos no tecido ósseo</i>	29
<i>II.3. Polímeros na construção de compósitos</i>	35
<i>II.4. Biocerâmica</i>	39
<i>II.5. Modificação de Superfície</i>	44
<i>II.6. Caracterizações</i>	48
<i>II.6.1. Determinação do Grau de Desacetilação da Quitosana</i>	48
<i>II.6.2. Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL)</i>	50
<i>II.6.3. Difractometria de raios X (DRX)</i>	52
<i>II.6.4. Espectrofotometria de Absorção na Região do Infravermelho</i>	53
<i>com Transformada de Fourier (IVTF)</i>	
<i>II.6.5. Termogravimetria (TG/DTG)</i>	55
<i>II.6.6. Porosidade por imersão</i>	56
<i>II.6.7. Intumescimento</i>	58
<i>II.6.8. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	60
<i>II.6.9. Espalhamento de raios X a Baixos Ângulos (SAXS)</i>	61

II.6.10. Tomografia de raios X utilizando fontes de Radiação Sincrotron (TCRS)	64
II.6.11. Ensaio de Viabilidade Celular (Citotoxicidade)	68
III. METODOLOGIAS	70
III.1. Síntese e modificação da superfície da hidroxiapatita (HAP)	70
III.2. Preparação dos Compósitos	70
III.3. Caracterização Física, Química, Morfológica e Estrutural	71
III.3.1. Determinação do Grau de Desacetilação da Quitosana	71
III.3.2. Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL)	72
III.3.3. Difratometria de raios X (DRX)	73
III.3.4. Espectrofotometria de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF)	74
III.3.5. Termogravimetria (TG/DTG)	74
III.3.6. Porosidade por imersão	74
III.3.7. Intumescimento	75
III.3.8. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	76
III.3.9. Espalhamento de raios X a Baixos Ângulos (SAXS)	77
III.3.10. Tomografia de raios X utilizando fontes de Radiação Sincrotron (TCRS)	78
III.3.11. Ensaio de Viabilidade Celular (Citotoxicidade)	78
IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES	80
IV.1 Caracterização Física, Química, Morfológica e Estrutural.	80
IV.1.1. Determinação do Grau de Desacetilação da Quitosana	80
IV.1.2. Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL)	82
IV.1.3. Difratometria de raios X (DRX)	87
IV.1.4. Espectrofotometria de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF)	91

<i>IV.1.5. Termogravimetria (TG/DTG)</i>	101
<i>IV.1.6. Porosidade por imersão</i>	110
<i>IV.1.7. Intumescimento</i>	113
<i>IV.1.8. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	116
<i>IV.1.9. Espalhamento de raios X a Baixos Ângulos (SAXS)</i>	127
<i>IV.1.10. Tomografia de raios X utilizando fontes de Radiação Sincrotron (TCRS)</i>	132
<i>IV.1.11. Ensaio de Viabilidade Celular (Citotoxicidade)</i>	139
V. CONCLUSÕES	143
VI. PERSPECTIVAS FUTURAS	146
REFERÊNCIAS	147
ANEXO	159

I. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1. *Considerações iniciais*

Tratar lesões oriundas de desordens, defeitos e doença em tecidos vivos tornou-se uma problemática em saúde devido ao tardio processo de cicatrização natural destes tecidos, aliados a uma limitada aceitação e compatibilidade do organismo com enxertos (BABAEI, JAHANSHAH, *et al.*, 2013; CAI, TONG, *et al.*, 2009). A reposição é usualmente feita pela implantação temporária ou permanente destes, cuja finalidade está na reabilitação das funções do tecido.

Entretanto, a utilização de tais materiais, sejam quais forem suas origens, podem ocasionar certos riscos à saúde do indivíduo, além de onerar gastos ao sistema público de saúde. A reposição do tecido ósseo iniciada na década de 70 no Brasil (UNIOSS, 2015), por exemplo, só em 2007 apresentou gastos de R\$ 575 milhões sendo que R\$ 146 milhões foram voltados para próteses e órteses ortopédicas, segundo o relatório de Materiais Avançados 2010-2022 do CGEE (Centro de Gestão em Estudos Estratégicos do Ministério de Ciência e Tecnologia do Brasil) (CGEE, 2010). Ademais, a substituição por certos enxertos apresenta como limitante os materiais atualmente utilizados, os quais podem causar necrose de tecidos adjacentes devido a liberação de íons metálicos, bem como a baixa disponibilidade do tecido em bancos de doadores de órgão (ARIFIN, SULONG, *et al.*, 2014).

Como estratégia aos tratamentos tradicionais e, vislumbrando a inserção de novos materiais no mercado biomédico, o desenvolvimento de biomateriais tem sido requerido. Os biomateriais, os quais são utilizados em substituição ou reparo de estruturas teciduais naturais que sofreram algum tipo de dano, apresentam um conjunto de propriedades físicas, químicas e biológicas que permitem que uma função desejada seja desempenhada, além de estimular uma resposta adequada aos tecidos vivos (ARIFIN, SULONG, *et al.*, 2014). Em ambientes fisiológicos, estas respostas induzem a uma interação tecidual: sendo bioinertes, biotoleráveis e bioativos (GUASTALDI,

APARECIDA, 2010). Os materiais bioativos, tais como biocerâmica e compósitos, são capazes de interagir com o tecido vivo sem formar tecido fibroso (GUASTALDI, APARECIDA, 2010; KUMAR, GIRIJA, *et al.*, 2010).

Diversos materiais de reconstituição já estão disponíveis no mercado, sendo a maioria deles baseada em matrizes poliméricas, compostos cimentícios ou órteses metálicas. A exemplo de materiais no mercado, os produtos Osteosynt® (Figura I.1) são confeccionados com uma mistura de duas biocerâmicas nano-estruturadas, a hidroxiapatita e o fosfato de tricálcio do tipo β , tendo como principais diferenciais uma matriz para adesão e diferenciação celular, ser um potencial veículo condutor e liberador de fármacos ou substâncias ativas, além de ser biocompatível.



Figura I.1. Biocerâmica OSTEOSYNT e suas diferentes apresentações. (Fonte: Eincobio. Disponível em: <<http://www.eincobio.com.br/2011/port/index/index.php>>)

Os compósitos bioativos podem ser também uma alternativa viável pois possibilitam níveis mínimos de não aceitação e maximiza a capacidade osteogênica *in vivo* (CAI, TONG, *et al.*, 2009; UEBERSAX, APFEL, *et al.*, 2013). O tecido ósseo natural é considerado um compósito devido a característica de sua estrutura formada por uma matriz orgânica e outra inorgânica organizadas hierarquicamente (ARMENTANO, DOTTORI, *et al.*, 2010; BABAEI, JAHANSHAH, *et al.*, 2013). Compósitos constituídos de biocerâmica, tais como hidroxiapatita, e um sistema polimérico possibilita que o

tecido lesionado se recupere através da interação químicas entre estes e o tecido. A hidroxiapatita é o maior componente inorgânico do tecido ósseo natural, fazendo desta biocerâmica a mais utilizada e estudada no campo biomédico (PIGHINELLI, KUCHARSKA, 2013; BABAEI, JAHANSHAHI, *et al.*, 2013). Quando associada a outros sistemas, como polímeros, as propriedades dos compósitos tornam-se melhoradas (ARMENTANO, DOTTORI, *et al.*, 2010).

Dentre inúmeros polímeros, os de estrutura semelhante à celulose e ao colágeno são os mais utilizados com finalidades biomédicas, devido a suas características químicas e estruturais, como a quitosana. Propriedades como facilidade de regeneração do tecido, biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade, maleabilidade de formas de compactação, liberação controlada de substâncias, combate a biofilmes bacterianos são algumas das características exibidas pela quitosana (ARMENTANO, DOTTORI, *et al.*, 2010; BABAEI, JAHANSHAHI, *et al.*, 2013).

A união das propriedades destes materiais, hidroxiapatita e quitosana, tem instigado inúmeras pesquisas no campo biomédico. Tais trabalhos visam a confecção de estruturas de composição biologicamente aceitáveis e que apresentem propriedades semelhantes com o tecido ósseo (ARMENTANO, DOTTORI, *et al.*, 2010; BAREIRO, SANTOS, 2014). Alterações na composição de compósitos de hidroxiapatita—quitosana poderá induzir uma melhora na compatibilidade biológica, podendo impulsionar interações entre o biomaterial e as células do tecido (GAO, ZHUANG, *et al.*, 2014; THEIN-HAN, MISRA, 2009).

Alterações de superfície do biomaterial podem promover um melhoramento nas propriedades dos compósitos. Compósitos de carga inorgânica dispersos sobre polímeros tendem a se aglomerar devido a inúmeros razões, provocando a segregação de fases, e conseqüentemente, a perda de desempenho (KANGO, KALIA, *et al.*, 2013; ZHOU, LEE, 2011; FERESHTEH, MALLAKPOUR, *et al.*, 2015). Modificar a superfície da biocerâmica mostra-se como perspectiva viável, já que estas são bastante reativas e estabelecem ligações químicas através de grupos ionizáveis em sua superfície

(OTHMANI, AISSA, *et al.*, 2013; FERESHTEH, MALLAKPOUR, *et al.*, 2015; BARABÁS, CZIKÓ, *et al.*, 2013).

O processo de modificação pode ser realizado de diversas formas e utilizando diversos agentes de modificação. A exemplo, o ácido esteárico, ácido graxo saturado encontrado no organismo, permite induzir melhorias na interação com outras substâncias, tais como biocerâmicas e metais (LI, WENG, 2008; NUNES, VALERIO, *et al.*, 2011; ZHANG, LI, *et al.*, 2012). Em vista disto, propor modificações na superfície da biocerâmica com o ácido esteárico para melhorar a interação interfacial com o polímero mostra-se adequado com o intuito de desenvolver estruturas de excelente compatibilidade biológica.

1.2. *Objetivos*

1.2.1 *Geral*

- Avaliar a estruturação de arcabouços porosos tridimensionais de compósitos de base cerâmica contendo polímeros sob a influência da composição nas características físicas, químicas, estruturais, morfológicas e biológicas para a possível utilização em reparação de tecido ósseo.

1.2.2. *Específicos*

- Sintetizar hidroxiapatita (HAP) através do método de precipitação por via úmida;
- Modificar a superfície da HAP com duas concentrações de AE através da metodologia de refluxo;
- Avaliar a formação e modificação da superfície da HAP nas características de tamanho, termogravimétricas, cristalográficas e morfologia;
- Comprovar os GD das diferentes quitosanas;
- Produzir compósitos de HAP-quitosana (QUI) incorporando hidroxietilcelulose usando a liofilização como método de obtenção de arcabouços tridimensionais;

- Verificar a influência da composição dos arcabouços no grau de intumescimento, porosidade, da morfologia de superfície, da estabilidade térmica, da cristalinidade e do ambiente químico (grupos químicos).
- Estudar a estrutura interna e morfológica dos compósitos sob influência da composição foi realizada através da tomografia de raios X;
- Observar a organização estrutural durante a liofilização usando o espalhamento de raios X a baixos ângulos;
- Avaliar a viabilidade celular dos compósitos em cultura celular.

II. REVISÃO DA LITERATURA

II.1. TECIDO ÓSSEO

Exercendo funções importantes para o organismo humano, tais como a reposição eletrolítica de íons, a sustentação e locomoção do esqueleto (PACUREANU, 2013), o tecido ósseo é uma das estruturas de tecido biológico mais complexa e suas propriedades estão extremamente associadas à composição e organização em seus variáveis níveis hierárquicos (PRZEKORA, PALKA, *et al.*, 2014).

Estruturalmente, o tecido ósseo pode ser subdividido em uma série de subcamadas: macroscópica, com a distinção de tecido cortical e trabecular; microscópica, com os osteons, lamelas e canais de Havers; e nanométrica, com cristais de hidroxiapatita e fibras de colágeno mineralizadas (FU, SAIZ, *et al.*, 2013; PACUREANU, 2013). A Figura II.1 abaixo ilustra a divisão de escalas encontradas nos níveis hierárquicos do osso, a exemplo da porção distal do fêmur.

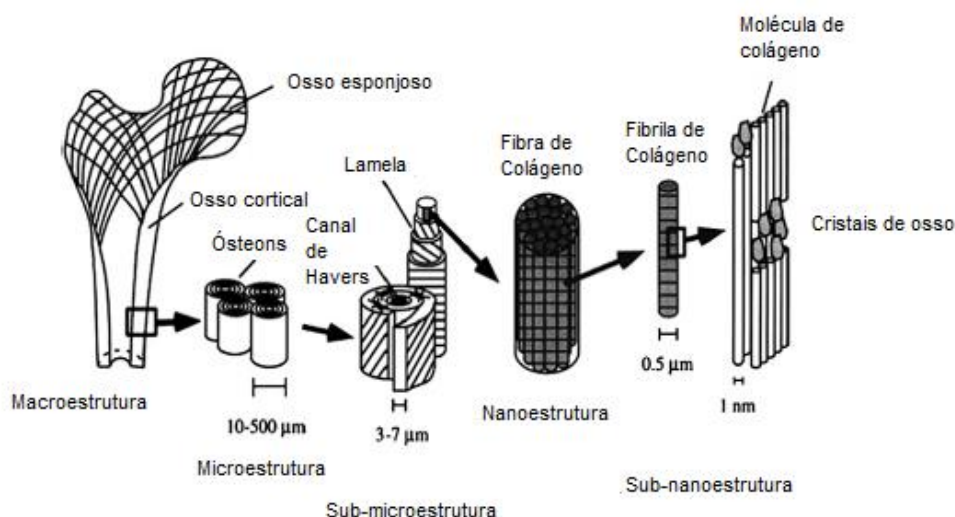


Figura II.1. Divisão das escalas estruturais do tecido ósseo. (Fonte: Adaptado de ZHOU, LEE, 2011)

Com uma micro e nanoestrutura complexa e de difícil reprodução, o osso é constituído, essencialmente, de 9% de água, 21% de colágeno (matriz orgânica), 69% de fosfatos de cálcio (majoritariamente a hidroxiapatita) e 1% de outros elementos, em função da massa (PACUREANU, 2013; PIGHINELLI, KUCHARSKA, 2013). Quando seco, este conjunto perfaz 95% do massa do osso (WEGST, BAI, *et al.*, 2015). O complexo de microestruturas, as quais ordenam-se em um arranjo estrutural único, atestam as características deste tecido, e promove a execução de suas funções essenciais ao organismo (PIGHINELLI, KUCHARSKA, 2013). São elas: eletrólitos, tais como íons de cálcio, magnésio, fosfatos; células, como osteócitos, osteoblastos e osteoclastos; proteínas, como colágeno, ácido hialurônico e glicoproteínas; elementos vasculares; lipídeos; água; e nanoestruturas, como a hidroxiapatita (TANEJA, PAREEK, *et al.*, 2012; FU, SAIZ, *et al.*, 2013; FLOREZ, TUNON, *et al.*, 2015).

A organização e interação de seus constituintes dão origem a duas subestruturas matriciais: matriz orgânica e matriz inorgânica (WANG, STRECKER, *et al.*, 2015; FU, SAIZ, *et al.*, 2013). Tal arranjo caracteriza o tecido como compósito natural, no qual os ossos e dentes *in natura* são formadas por pequenos cristais de apatita entrelaçadas em fibras de colágenos (WEGST, BAI, *et al.*, 2015; ZHOU, LEE, 2011; PRZEKORA, PALKA, *et al.*, 2014; TANEJA, PAREEK, *et al.*, 2012). Estas combinações dos nanocristais de apatita (placas de tamanho 25 x 50 nm, 1,5-4 nm de espessura) e o colágeno do tipo I (medindo aproximadamente 300 x 1,5 nm) são responsáveis pelas características finais do tecido ósseo, como exemplo, a resistência mecânica (TANEJA, PAREEK, *et al.*, 2012; FLOREZ, TUNON, *et al.*, 2015; PACUREANU, 2013; WEGST, BAI, *et al.*, 2015).

Sob o aspecto macroscópico, o tecido ósseo é formado por dois tipos de tecido, com organizações diferentes, constituídos de lamelas organizadas diferenciadamente para exercer suas funcionalidades (REZNIKOV, CHASE, *et al.*, 2015): seções compactas, ou corticais; e esponjosas, ou trabeculares (Figura II.2) (PACUREANU, 2013; FU, SAIZ, *et al.*, 2013). A proporção entre estes sub-tecidos é variável ao longo

do esqueleto; na coluna vertebral, por exemplo, predomina o tecido esponjoso. A forma compacta do osso é quase um bloco denso, envolta do periósteo (PACUREANU, 2013), com espaços apenas para osteócitos, canalículos e vasos sanguíneos e pelo sistema nervoso periférico, formando uma matriz organizada em forma de lamelas concêntricas fortemente ligadas entre si de tal forma a eliminar espaços inter-laminulares, o que confere ao osso rigidez e resistência (RHO, KUHN-SPEARING, *et al.*, 1998; OJANEN, ISAKSSON, *et al.*, 2015; REZNIKOV, CHASE, *et al.*, 2015). Dada esta característica, este tecido é rígido e resistente. Ele é responsável por 85% da massa esquelética, e está presente nas extremidades dos ossos longos e nos revestimentos de todos os ossos do organismo.

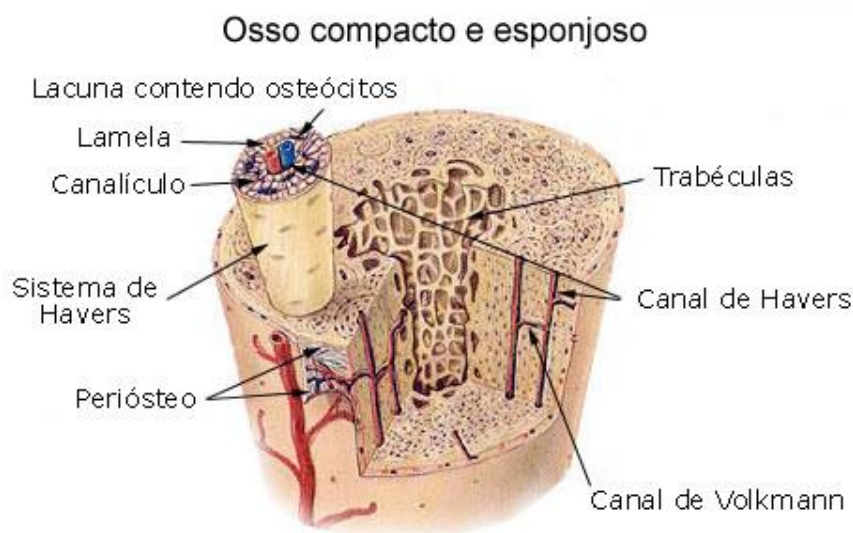


Figura II.2. Tecido ósseo e sua organização estrutural e hierárquica. (Fonte: InforEscola. Disponível em: <www.infoescola.com>)

Em contraste, o osso esponjoso é 50-90% poroso, fazendo-o ter elasticidade e força compressiva quase 10 vezes menor do que a do osso cortical (RHO, KUHN-SPEARING, *et al.*, 1998). O osso esponjoso corresponde a 15% da massa óssea, recoberta por uma membrana chamada de endósteo o qual contem osteoclastos e osteoblastos responsáveis pela reabsorção óssea (PACUREANU, 2013; REZNIKOV,

CHASE, *et al.*, 2015), e é encontrado nos corpos vertebrais, nas epífises dos ossos longos e nos ossos chatos. O nome refere-se a lamelas espaçadas, de formato irregular e porosidade variada, e unidas por junções trabeculares (IRASTORZA, CARLEVARO, *et al.*, 2013; REZNIKOV, CHASE, *et al.*, 2015). Este conjunto de tecidos e elementos substanciais (células, matrizes extracelulares e os íons) confere ao osso a resistência mecânica suficiente para exercer atividades de sustentação e locomoção do corpo humano (FLOREZ, TUNON, *et al.*, 2015; IRASTORZA, CARLEVARO, *et al.*, 2013; OJANEN, ISAKSSON, *et al.*, 2015; PACUREANU, 2013).

Altamente dinâmico e vascularizado, o tecido continua a se remodelar ao longo da vida de um indivíduo, auto reorganizando, destruindo-se e construindo-se quando necessário em intervalos de 3 a 4 meses, ou quando há perdas de pequenos volumes ósseos (TANEJA, PAREEK, *et al.*, 2012).

Dentre todos os tecidos do corpo humano, o ósseo é o mais transplantado em todo mundo (TANEJA, PAREEK, *et al.*, 2012; FU, SAIZ, *et al.*, 2013). Na prática clínica, os prováveis substitutos ósseos podem ser enxertos autógenos, de origem humana de outro indivíduo sadio; auto enxertos, do mesmo indivíduo e de locais sadios; e os aloenxertos, de espécie diferente. Todas estas possibilidades oferecem limitações devido a inúmeras desvantagens, como a probabilidade de contaminação e infecções, além da baixa disponibilidade (TANEJA, PAREEK, *et al.*, 2012; SAIZ, ZIMMERMANN, *et al.*, 2013; FU, SAIZ, *et al.*, 2013; BABAEI, JAHANSHAH, *et al.*, 2013; IRASTORZA, CARLEVARO, *et al.*, 2013).

II.2. ARCABOUÇOS 3D: BIOMATERIAIS PARA REPAROS NO TECIDO ÓSSEO

Motivados pela grande demanda de transplantes de enxertos ósseos, pela descoberta de novos materiais e pelas notáveis propriedades dos materiais de origem natural e sintética, o desenvolvimento de biomateriais com composição e estrutura

semelhante aos tecidos biológicos tem instigado altos investimentos tecnológicos (FU, SAIZ, *et al.*, 2013). A fim de promover a formação de novos produtos com aplicabilidade na reconstituição e reparo de tecidos lesionados, a engenharia biomédica tem centrado esforços na estruturação de biomateriais focando na aproximação sistemática da complexidade estrutural destes tecidos, e como as interações que ocorrem nos sistemas biológicos, podem ser reproduzidas (BABAEI, JAHANSHAH, *et al.*, 2013; FU, SAIZ, *et al.*, 2013; THEIN-HAN, MISRA, 2009).

Os biomateriais são utilizados em substituição ou reparo de estruturas teciduais naturais às quais sofreram algum dano. O conjunto de propriedades físicas, químicas e biológicas destes permite que uma função desejada seja desempenhada, além de estimular uma resposta adequada aos tecidos vivos (MOHAMED, EL-RASHIDY, *et al.*, 2011).

A indução de uma resposta tecidual após contato com fluidos corpóreos circundantes e tecido natural classificam os biomateriais em: *bioinertes*, *biotoleráveis* e *bioativos* (GUASTALDI, APARECIDA, 2010). Os materiais bioinertes e biotoleráveis promovem uma encapsulação do implante por uma camada de tecido fibroso não aderente, tornando-os menos requisitados na escolha do implante ideal. Já os bioativos são capazes de interagir sem a intervenção de tecido fibroso, como ocorre com compósitos de fosfato de cálcio e polímero, os quais tem recebido especial atenção particularmente para reparos no tecido ósseo, sejam de substituição, revestimento ou suporte para crescimento celular (PIGHINELLI, KUCHARSKA, 2013; TANEJA, PAREEK, *et al.*, 2012; KUMAR, GIRIJA, *et al.*, 2010).

O biomaterial ideal para reparação óssea deve possuir certos atributos, devendo ser essencialmente biocompatível, reabsorvível, bioativo, osteogênico e não tóxico. Aliado a estas propriedades, o material deverá desempenhar funções similares ao tecido, bem como habilidades de ancorar células, promover a neovascularização, combinar sua composição, permitir sua auto reabsorção, não formar subprodutos tóxicos ou irritantes ao tecido, assentir a interação com o tecido vivo, ser adaptável ao

tecido, ser osteocondutivo, promover a fixação de células, e possuir boas propriedades mecânicas (SAIZ, ZIMMERMANN, *et al.*, 2013; FU, SAIZ, *et al.*, 2013). As estruturas porosas tridimensionais conseguem executar tais requisitos atendendo as exigências do tecido lesionado (FU, SAIZ, *et al.*, 2013).

Estruturas tridimensionais, com alta porosidade, que possam prover suporte ao crescimento celular bem como carrear substâncias ativas que auxiliem a regeneração do tecido ou que combatem processos infecciosos ocasionados pela lesão tem sido elaborada nos últimos anos. A estas estruturas dá-se o nome de *arcabouços 3D* (tridimensionais) (SAIZ, ZIMMERMANN, *et al.*, 2013).

Estes arcabouços, além de apresentar a função de comportar células, eles devem ser projetados para aumentar a adesão e proliferação celular sobre a superfície (HOFMANN, HILBE, *et al.*, 2013). A alta porosidade usualmente significa alta razão entre área e volume de superfície, o que favorece o processo de adesão celular, responsável pela regeneração tecidual (JIN, KIM, *et al.*, 2012; STILLER, RACK, *et al.*, 2009; THEIN-HAN, MISRA, 2009). Apesar do aumento da porosidade diminuir a resistência mecânica do material isoladamente, a existência de poros com dimensões adequadas pode favorecer o crescimento de tecido através deles, fazendo com que ocorra um forte entrelaçamento do tecido com o implante, aumentando, por conseguinte, a resistência do material *in vivo* (UEBERSAX, APFEL, *et al.*, 2013; REZNIKOV, CHASE, *et al.*, 2015).

A estrutura micrométrica dos arcabouços é dependente da metodologia empregada para sua obtenção. FU, SAIZ, *et al.*, (2013) em seu trabalho conseguiram compilar e classificar a microestrutura de arcabouços caracterizando-os de acordo com a porosidade apresentadas por estes, detalhada na Tabela II.1.

Tabela II.1. Estruturas micrométricas de arcabouços e suas características definidas por FU, SAIZ, *et al.*, (2013).

Classificação	Ordenamento	Dimensão	Porosidade	Métodos de processamento
Isotrópico	Poros irregulares, de aparência esférica, interligados e aleatórios em todas as dimensões	10-800 μm	24-96%	Processos sol-gel, replicação de polímeros e o processo <i>foam-mat</i>
Anisotrópico	Poros orientados	10-40 μm	20-70%	Extrusão, filamento de enrolamento, deposição eletroforética, replicação, e o congelamento de suspensões
Periódico	Porosidade periódica, morfologia variável	100-500 μm	40-70%	Prototipagem rápida ou de forma livre em base sólida

A Figura II.3 ilustra as três diferentes classificações de estrutura micrométrica de acordo com FU, SAIZ, *et al.*, (2013): isotrópico, anisotrópico e periódico.

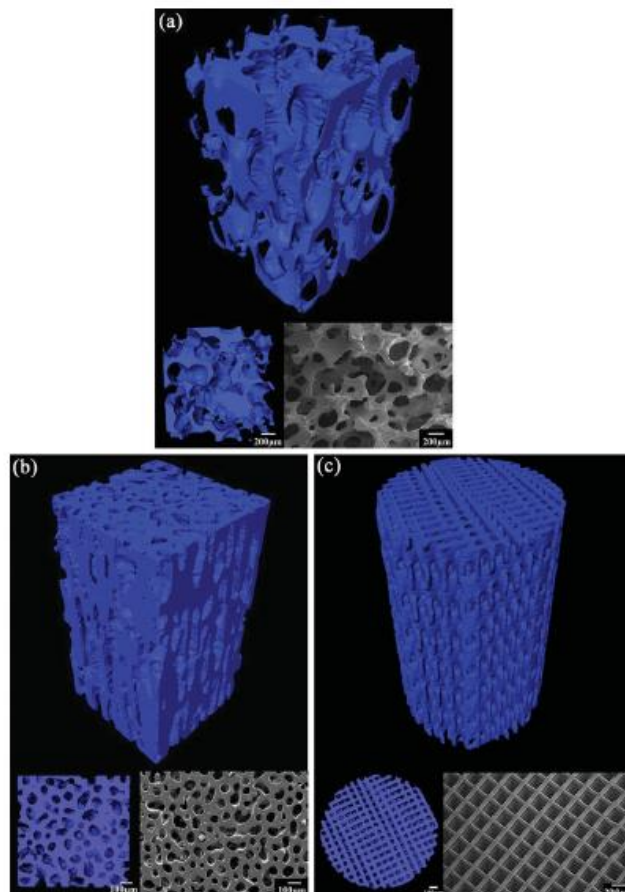


FIGURA II.3. Imagens representativas de arcabouços 3D formados por diferentes técnicas: (a) Isotropia; (b) Anisotropia, e (c) Periodicidade. (Fonte: FU, SAIZ, *et al.*, 2013)

O processo de congelamento de suspensões seguido da secagem por liofilização é uma das diversas técnicas utilizadas na confecção de estruturas 3D. Esta técnica consiste em congelar a amostra e submetê-la a variações de pressão mantendo em temperaturas baixas: princípio físico da sublimação. Ela permite a obtenção de materiais porosos de elevada área superficial e grau de porosidade variável, o que corrobora para alterações em suas propriedades, principalmente as mecânicas e de absorção de fluidos (intumescimento) (CAI, TONG, *et al.*, 2009; HOFMANN, HILBE, *et al.*, 2013).

Os arcabouços produzidos pela liofilização caracterizam-se por serem anisotrópicos. Porém, dentre as técnicas anisotrópicas, esta propicia o controle do tamanho do poro bem como do grau de porosidade. O processo de congelamento com

solidificação unidirecional promove a formação de cristais de gelo homogêneos, permitindo que agregados poliméricos dispersos permaneçam ao redor dos canais cristalizados. A organização estrutural do canal aquoso congelado deve-se a variações de concentração de soluto e de parâmetros como temperatura e velocidade de congelamento. O resultado é a formação de canais homogêneos e de estrutura indefinível, causada pela anisotropia na formação dos cristais de gelo (SCHOOFF, APEL, *et al.*, 2001).

Na deposição eletroforética, também uma técnica anisotrópica, a formação de estruturas atraentes a partir de misturas de cerâmicas devido ao seu sistema simples pode ser formada. A liberação de gases (H_2 e O_2) na deposição eletroforética em meio aquoso induzem a formação de defeitos (poros e vazios) no arcabouço. É um processo que resulta no fabrico de cerâmicas com poros contínuos e alinhados unidirecionalmente, não conduzindo danos ao ambiente (NAKAHIRA, NISHIMURA, 2003). O dimensionamento dos canais poros dá-se pela inserção os parâmetros ajustáveis ao projeto e pode ser conseguido através da impressão tridimensional. As impressões de objetos tridimensionais são conduzidas pela deposição em camadas do material utilizado por meio de deposição de um agente aglutinante, permitindo o ajuste das características desejadas ao produto final pelo delineamento da estrutura. (FU, SCHLIER, *et al.*, 2013). Diferentes “biotemplates” tem sido proposto para a condução de organização de estruturas tridimensionais utilizando diferentes rotas de processamento baseados na infiltração de suspensões de baixa viscosidade. A indução de ar resulta na queima do molde de biocarbono, e assim, a estrutura porosa é consolidada (RAMBO, SIEBER, 2005). Todas estas metodologias proporcionam a fabricação de estruturas tridimensionais com controle de tamanhos de poros, mas requerem gastos com maquinários sofisticados para obtenção destas. Deste modo, o congelamento de suspensões seguido de liofilização apresenta-se mais vantajoso.

Quando o controle do processo, como velocidade de congelamento, temperatura de congelamento, tipo de solvente, concentração de partículas e variação da pressão, é executado, estruturas de tamanho de poros e porosidade definidos são obtidos (FU, SAIZ, *et al.*, 2013). Estudar, avaliar e observar como ocorre tais processos é importante para o campo biomédico (BANDYOPADHYAY, MALWELA, *et al.*, 2012).

A mimetização estrutural recorre não somente ao desempenho de propriedades de um material, mas também de sua micro e macroestrutura aliado à sua composição. A escolha do material ideal para reposição do tecido lesionado dependerá das características e propriedades requeridas para restabelecimento da sua função (HOFMANN, HILBE, *et al.*, 2013). Biomateriais do tipo compósito pode adequar-se a esta problemática e reparar o dano tecidual (WEGST, BAI, *et al.*, 2015; ZHOU, LEE, 2011; PRZEKORA, PALKA, *et al.*, 2014; TANEJA, PAREEK, *et al.*, 2012). Deste modo, compósitos sintéticos confeccionados para tal finalidade devem induzir uma resposta a reconstrução do tecido com boa compatibilidade (ZHANG, LIU, *et al.*, 2012).

Diversos materiais são utilizados na confecção de arcabouços 3D, dentre eles os polímeros, os quais são facilmente moldáveis a formas variáveis. A utilização de polímeros na formação de arcabouços 3D vem sendo aplicada na regeneração de ossos ou na confecção de suportes devido a flexibilidade polimérica.

II.3. POLÍMEROS NA CONSTRUÇÃO DE COMPÓSITOS

A quitosana (Figura II.4) é um polissacarídeo constituído de subunidades poliméricas de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina unidas por ligações o-glicosídicas formando, assim, um copolímero catiônico linear (PILLAI, PAUL, *et al.*, 2009; LIU, CHEN, *et al.*, 2014). Ela é obtida a partir da hidrólise química da quitina sob tratamentos álcalis severos em altas temperaturas ou por reações de hidrólise enzimática na presença de enzimas como a deacetilase de quitina (CROISIER, JÉRÔME, 2013; BEIL, SCHAMBERGER, *et al.*, 2012). A proporção destas unidades

poliméricas é dependente da eficácia do tratamento, e pode originar uma diversidade de quitosanas.

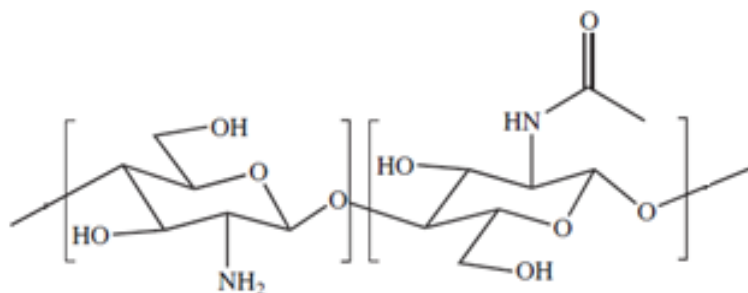


Figura II.4. Representação esquemática da estrutura química da quitosana. (Fonte: CROISIER, JÉRÔME, 2013)

A quitosana possui uma configuração química semelhante ao colágeno (maior constituinte da fase orgânica do osso) (BARABÁS, CZIKÓ, *et al.*, 2013). Suas propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade, prevenção de biofilmes bacterianos, bioadesividade estimulada por fluidos orgânicos contendo mucina, capacidade de estimular a migração e proliferação celular, além de favorecer a reorganização da arquitetura histológica da célula, faz deste polímero um excelente material a ser utilizado em diversos campos biomédicos (JIN, KIM, *et al.*, 2012; LIU, CHEN, *et al.*, 2014; ZHANG, LIU, *et al.*, 2012; MIRONENKO, MODIN, *et al.*, 2014).

A quitosana tem importância econômica e ambiental, uma vez que sua matéria-prima (quitina) é derivada de resíduos abundantes e rejeitada pela indústria pesqueira (MOHAMED, EL-RASHIDY, *et al.*, 2011; PIGHINELLI, KUCHARSKA, 2013). Este polímero catiônico é insolúvel em meio aquoso, mas solúvel em soluções ácidas diluídas (PILLAI, PAUL, *et al.*, 2009; JANEGITZ, LOURENÇÃO, *et al.*, 2007; LIU, CHEN, *et al.*, 2014). Entretanto, por se tratar de um polímero, alguns problemas tornam seu manuseio e utilização um pouco complicadas, tais como a forma física, a resistência mecânica, a degradação do material no organismo, o tempo de permanência sob o tecido.

A utilização da quitosana dificulta o surgimento e proliferação bacteriana já que uma de suas propriedades é a destruição dos micro-organismos pela imobilização ou fixação, evitando que estes se adiram à superfície do tecido (BHARDWAJ, KUNDU, 2011).

A semelhança entre a estrutura química da quitosana com o ácido hialurônico reforça o seu uso como agente reparador e cicatrizador, pois a quitosana aumenta a atividade de células inflamatórias, promovendo organização celular e reparando amplas feridas (LEWANDOWSKA, SIONKOWSKA, *et al.*, 2015).

Devido a sua configuração química, a quitosana é rígida e pode ser preparada sob forma de filmes. Os filmes deste polímero são capazes de apresentar permeabilidade a gases, controlada perda de água e exsudatos (PENG, LI, 2014). Sua aplicação para a regeneração óssea tem sido comprovada por estudos em cultura celular, na qual a quitosana atua na reparação tecidual auxiliando na função de fatores de crescimento e na atividade celular dos osteoblastos, fazendo dela um bom candidato à engenharia de tecidos (ZHANG, LIU, *et al.*, 2012; ZHANG, DAI, *et al.*, 2012; THEIN-HAN, MISRA, 2009; PIGHINELLI, KUCHARSKA, 2013; PETER, GANESH, *et al.*, 2010; WILSON JR., HULL, 2008).

Quando reticulada ou associada a outros sistemas, como as biocerâmicas, os filmes de quitosana podem melhorar suas propriedades mecânicas, como resistência a tração e resistência elástica, e ao mesmo tempo servir como veículo de liberação de fármacos e substâncias ativas (SALCEDO, AGUZZI, *et al.*, 2012; PIGHINELLI, KUCHARSKA, 2013; TANEJA, PAREEK, *et al.*, 2012). Estes compósitos (biocerâmica-polímero) reduzem a possibilidade de não aceitação, pois esta combinação tem mostrado uma maximização da capacidade osteogênica *in vivo*, permitindo o crescimento interno no compósito com a reabsorção acelerada da matriz (PIGHINELLI, KUCHARSKA, 2013).

A quitosana é hidrofílica, mas intumescce aumentando o seu volume que se torna flexível e elástico, mantendo sua forma, até alcançar um balanço físico-químico. São

chamados de hidrogéis e estruturas advindas deste material são afetadas pelo teor de água no estado de equilíbrio durante o intumescimento. Os hidrogéis podem ser preparados com materiais de diversas origens. As principais propriedades que são influenciadas pelo grau de intumescimento são: permeabilidade, propriedades mecânicas, propriedades de superfície e biocompatibilidade. Propriedades físicas baseada no teor de água, consistência flexível e rugosa têm grande importância deste polímero no uso como biomateriais (SWARBRICK, 2007; BARDAJEEA, POURJAVADI, *et al.*, 2011; ROWE, SHESKEY, *et al.*, 2009; CROISIER, JÉRÔME, 2013).

A capacidade da quitosana de dispersar e sustentar partículas é dependente de sua arquitetura tridimensional e hidrofília ao formar hidrogéis após o intumescimento, e apresenta-se limitada. Agentes espessantes ou de viscosidade, como a hidroxietilcelulose (HEC) (Figura II.5), podem promover uma boa dispersão e sustentação de cargas em hidrogéis de quitosana. É um material atóxico e não irritante usado em preparações farmacêuticas, cuja viscosidade é dependente de sua cadeia polimérica e substituições (ROWE, SHESKEY, *et al.*, 2009).

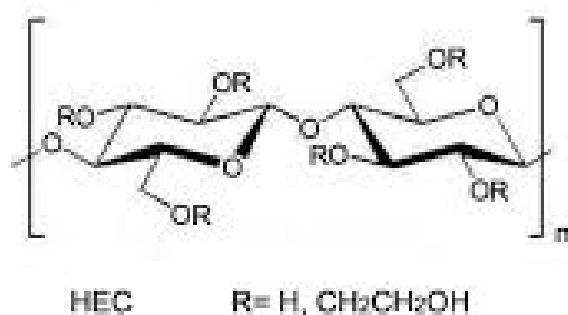


Figura II.5. Representação esquemática da estrutura química do hidroxietilcelulose.
(Adaptado de VILELA, 2010)

A HEC é um polímero não iônico solúvel em água derivado da celulose, substituída por poli (hidroxietil) éter de celulose. Ela pode ser encontrada em diferentes classes tendo como pontos variantes a viscosidade aparente e o grau de substituição

da cadeia de celulose. Mas também por suas atividades, que podem ser descritas como agentes de revestimento, de suspensão, espessante e de viscosidade. Soluções podem ser submetidas a ciclos gelo-degelo, a altas temperaturas, sem ocorrer precipitação ou gelificação. Este polímero tem uso amplo, devido a suas características, mas é mais usado em formulações farmacêuticas tópicas e oftálmicas. É um material não tóxico e não irritante. Estudos de toxicidade oral aguda e subaguda em ratos têm mostrado efeitos não tóxicos atribuídos ao consumo da HEC, sendo nem absorvidos nem hidrolisados no trato gastrointestinal de ratos. Contudo, embora o uso em formulações farmacêuticas orais, a HEC não tem sido aprovada para uso direto em alimentos (ROWE, SHESKEY, *et al.*, 2009).

Porém, sua baixa resistência mecânica os impede de serem utilizados isoladamente, o que usualmente vem associados a incorporação de outros materiais que confirmam a estrutura aporte mecânico ideal ao desempenho pretendido (FU, SAIZ, *et al.*, 2013; CROISIER, JÉRÔME, 2013, FANG, FENG, 2014). Um destes materiais é a hidroxiapatita, cuja interação química com o polímero pode melhorar as propriedades do arcabouço (FU, SAIZ, *et al.*, 2013; HE, CHANG, *et al.*, 2012; JIN, KIM, *et al.*, 2012).

II.4. BIOCERÂMICA

Biomateriais cerâmicos derivados de fosfatos de cálcio, tais como hidroxiapatita, são utilizados como um dos principais componentes inorgânicos no revestimento de implantes metálicos e na produção de estruturas ósseas sintéticas (VICTOR, SHARMA, *et al.*, 2011; SON, APPLEFORD, *et al.*, 2011). Apresentam propriedades de interesse biológico (biocompatibilidade e bioatividade), além da similaridade ao maior componente inorgânico do tecido ósseo natural (hidroxiapatita), fazendo destas biocerâmicas um dos biomateriais inorgânicos mais utilizados no campo médico (WANG, XU, *et al.*, 2012; GINEBRA, CANAL, *et al.*, 2012; KUMAR, SRINIVASAN, *et al.*, 2011).

Estas são utilizadas, em geral, na medicina clínica e cirúrgica devido a suas interações com tecidos humanos (SON, APPLEFORD, *et al.*, 2011; VICTOR, SHARMA, *et al.*, 2011). A produção e comercialização de cerâmicas com formas, composição e características físico-químicas diferentes dependem do processo de obtenção (GINEBRA, CANAL, *et al.*, 2012). A razão molar entre os átomos de cálcio e fósforo (razão Ca/P), a qual pode variar em uma escala de 0,5 a 2,0, consiste em uma das formas de classificar os fosfatos de cálcio, como descrita na Tabela II.2 abaixo (PARK, LEE, *et al.*, 2012).

Tabela II.2. Tipos de fosfato de cálcio e suas razões Ca/P.

Nome da biocerâmica	Fórmula química	Razão Ca/P	Referência
Fosfato monoclálcico mono-hidratado	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5	GUASTALDI, APARECIDA, 2010
Monohidrogênio fosfato de cálcio	CaHPO_4	1,0	LIMA, 2010
Fosfato tricálcio (α, β, γ)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	CHEN, CHEN, <i>et al.</i> , 2009
Hidroxiapatita deficiente de cálcio	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ ($0 < x < 1$)	1,5-1,55	PARK, LEE, <i>et al.</i> , 2012
Hidroxiapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67	CHAVAN, BAHIR, <i>et al.</i> , 2010
Fluorapatita	$\text{Ca}_{10}\text{PO}_4\text{F}_2$	1,67	PEIXOTO, 2011
Fosfato tetracálcio	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	2,0	GUASTALDI, APARECIDA, 2010

A hidroxiapatita sintética possui razão molar entre os átomos de cálcio e fósforo consistente com a razão estequiométrica do composto natural ($\text{Ca/P} = 1,67$), e sua forma e características físico-químicas são dependentes do processo de obtenção (GINEBRA, CANAL, *et al.*, 2012). No geral, ela é bioativa, permitindo uma interação entre o material e o tecido, podendo acelerar a formação de apatita óssea na superfície do implante; é biocompatível, não induzindo a inflamação, bem como osteocondutiva, biofuncional, não tóxica e não alergênica (HE, CHANG, *et al.*, 2012; JIN, KIM, *et al.*, 2012; XIANMIAO, YUBAO, *et al.*, 2009; KUMAR, SRINIVASAN, *et al.*, 2011), razões pelas quais é extensamente utilizada em aplicações médicas. Camadas de HAP criadas na superfície de implantes são essenciais para que ligações químicas se formem entre o implante e o tecido, quando em contato com os fluidos envolventes do osso (GINEBRA, CANAL, *et al.*, 2012; PIGHINELLI, KUCHARSKA, 2013; SARAVANAN, NETHALA, *et al.*, 2011).

De fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Figura II.6), tendo seu nome sugerido em 1912 por sua característica de apatita hidroxilada (ARIFIN, SULONG, *et al.*, 2014), pode ser obtida pela desidrogenação do tecido ósseo (VICTOR, SHARMA, *et al.*, 2011; XIANMIAO, YUBAO, *et al.*, 2009; FANG, FENG, 2014) e por diferentes rotas físicas e químicas de produção de materiais, tais como precipitação de soluções aquosas ou reações de estado sólido (PARK, LEE, *et al.*, 2012; ZHOU, LEE, 2011) e tratamento hidrotérmico (FANG, FENG, 2014; ARIFIN, SULONG, *et al.*, 2014; PATHI, LIN, *et al.*, 2011).

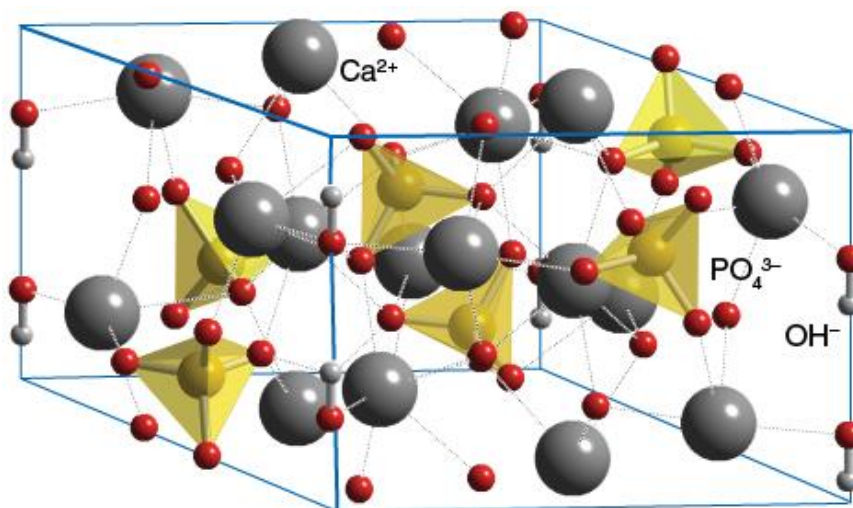


Figura II.6. Representação esquemática da estrutura química da hidroxiapatita. (Fonte: ChemTube3D, 2016, disponível em: <
<http://www.chemtube3d.com/solidstate/SShydroxyapatite.htm>>)

Devido a possibilidade da presença de diversos íons na estrutura cristalina e na superfície da apatita óssea, (Mg^{2+} , Sr^{2+} , Fe^{2+} , Pb^{2+} , Na^+ , K^+ , CO_3^{2-} , F^- , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^-), a HAP participa ativamente na troca iônica com o meio fisiológico, mantendo a homeostase natural do organismo. A liberação de íons cálcio e fosfato, por exemplo, presentes na HAP, tem efeitos sob a atividade celular óssea e mesenquimal, nas repostas específicas na remodelação óssea (GINEBRA, CANAL, *et al.*, 2012).

Diversas aplicações médicas são reportadas na literatura para o uso da HAP: revestimento de próteses metálicas (VICTOR, SHARMA, *et al.*, 2011), liberação controlada de substâncias ativas (WANG, XU, *et al.*, 2012), suporte para regeneração guiada (JIN, KIM, *et al.*, 2012), preenchimento dental (KUMAR, SRINIVASAN, *et al.*, 2011), favorecimento de adesão e crescimento celular (SARAVANAN, NETHALA, *et al.*, 2011), substituto de tecidos duros (ARIFIN, SULONG, *et al.*, 2014), combinação com polímeros na formação de compósitos (SON, APPLEFORD, *et al.*, 2011; FANG, FENG, 2014), tratamento de defeitos e traumas buco-maxilares, e homeostase (GINEBRA, CANAL, *et al.*, 2012).

A presença de microporos em biocerâmicas de HAP é dependente do processo de preparo e confere a HAP características importantes e essenciais à restauração, por exemplo, do tecido ósseo, pois estes poros têm a função de manter a vascularização local e de permitir o desenvolvimento de um sistema de vasos capilares intercalado com a cerâmica porosa (JIN, KIM, *et al.*, 2012; SON, APPLEFORD, *et al.*, 2011; PIGHINELLI, KUCHARSKA, 2013). A alta porosidade proporciona uma maior integração do tecido ao implante (bioatividade) (SON, APPLEFORD, *et al.*, 2011).

Na literatura são reportados diversos métodos de síntese sendo os principais: precipitação a partir de soluções aquosas, reações de estado sólido, microemulsões, método sol-gel e método hidrotermal (ZHOU, LEE, 2011). Sua estrutura cristalina e a razão Ca/P tem aproximação com a apatita natural e dependem do processo de obtenção do biomaterial. Em pH fisiológico, são termodinamicamente estáveis e o processo de reabsorção dos íons de cálcio e fosfato depende do perfil de solubilidade da cerâmica, a qual está inversamente relacionada à razão molar Ca/P, quanto maior esta, menor a solubilidade (PIGHINELLI, KUCHARSKA, 2013).

Sob altas temperaturas, geralmente acima de 850°C em atmosfera reativa, sofrem de-hidroxilação, o qual consiste na remoção de hidroxilas de sua estrutura (ARIFIN, SULONG, *et al.*, 2014), produzindo outros derivados de fosfato de cálcio, tais como o fosfato tri cálcio (TCP). Contudo, a baixas temperaturas, ela pode tornar-se moldável e ser injetadas *in vivo* (GINEBRA, CANAL, *et al.*, 2012).

O método de reação e precipitação de íons cálcio e fosfato a partir de soluções precursoras consistem em um dos métodos mais utilizados devido à simplicidade e pelo baixo custo. Entretanto, as baixas qualidades na distribuição do tamanho e da alta aglomeração das partículas são pontos importantes da técnica os quais requerem atenção (CENGIZ, GOKCE, *et al.*, 2008), principalmente quando esta cerâmica se encontra em interação com outros materiais, como em compósitos poliméricos em hidrogéis. Nestes sistemas a interação inorgânico-orgânico é estabelecida na interface

destes e dependem, dentre outros fatores, da polaridade dos constituintes e da aglomeração das partículas (LI, WENG, 2008).

II.5. MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE

Arcabouços 3D desempenham um importante papel na restauração da estrutura do tecido ósseo. A adequação da superfície pode, ou não, favorecer a interações entre o implante e o tecido biológico e promover a adesão celular (GAO, ZHUANG, *et al.*, 2014; THEIN-HAN, MISRA, 2009). Estes arcabouços formados por compósitos de base orgânica e inorgânica são construídos através da incorporação de partículas inorgânicas em malhas poliméricas. O desempenho apresentado pelo compósito seja ele mecânico, térmico, biológico entre diversos outros, é melhorado após a união destes materiais para formação do compósito (KANGO, KALIA, *et al.*, 2013; FANG, FENG, 2014; XIANMIAO, YUBAO, *et al.*, 2009).

A interação interfacial entre partículas inorgânicas e o polímero é um dos principais fatores que afetam as propriedades dos compósitos (ARMENTANO, DOTTORI, *et al.*, 2010; KANGO, KALIA, *et al.*, 2013; FERESHTEH, MALLAKPOUR, *et al.*, 2015). Um dos fatores que reduzem o desempenho dos compósitos está na formação de aglomerados de nanopartículas após a sua incorporação na dispersão polimérica. Isto é resultado da elevada área superficial, polaridade de superfície, e prevalência de uma dispersão insuficiente de nanopartículas inorgânicas na malha polimérica, o que torna quase incompatíveis com polímeros (KANGO, KALIA, *et al.*, 2013; ZHOU, LEE, 2011; FERESHTEH, MALLAKPOUR, *et al.*, 2015). Partículas nanométricas possuem elevada área superficial, conseqüentemente, possuem uma elevada energia livre de superfície (NESAMONY, SINGH, *et al.*, 2012), o que promove a aglomeração.

Um outro empecilho é a dispersão destas partículas nanométricas na corrente sanguínea ou subprodutos de sua degradação, o que ativa o sistema imunológico a

liberar macrófagos para a sua fagocitação e eliminação. A exemplo, os fosfatos de cálcio iniciam sua degradação química após incorporação no organismo, liberando íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} para aderir-se ao substrato ósseo ou partir para circulação sanguínea, e depositar-se em outros órgãos e tecidos (KANGO, KALIA, *et al.*, 2013; LEE, LOO, *et al.*, 2014).

A superfície da hidroxiapatita é bastante reativa, e os sítios de interação Ca^{2+} e PO_4^{3-} e de grupos hidroxilas podem promover um maior controle de liberação *in vivo*, sem alterar a compatibilidade do biomaterial. A adesão de agentes modificadores na superfície da HAP é proposta com base nas interações entre estes íons e grupos aniônicos de outras moléculas (OTHMANI, AISSA, *et al.*, 2013; FERESHTEH, MALLAKPOUR, *et al.*, 2015; BARABÁS, CZIKÓ, *et al.*, 2013).

As hidroxilas podem ser sítios de interação através do ancoramento de moléculas diversas que possam favorecer a desaglomeração e melhorar a distribuição das partículas na matriz. Este processo ocorre pela inserção de estruturas ou moléculas à superfície, limitando seu crescimento e promovendo interações com compostos de constituição semelhante a esta (BARABÁS, CZIKÓ, *et al.*, 2013).

FERESHTEH, MALLAKPOUR, *et al.* (2015) propuseram que a adição de alguns aminoácidos a superfície de nanopartículas de hidroxiapatita fluoretada [FHA: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_{2-x}\text{F}_x$, onde x representa o grau de fluoretação] dopada com magnésio ocorreria pela formação de ligações de hidrogênio entre o aminoácido e as hidroxilas das nanopartículas. Eles comprovaram, através de seus resultados, que realmente ocorria a formação de ligações de hidrogênio favorecidas pelas hidroxilas da apatita e que estas promoviam uma dispersão homogênea das nanopartículas.

Uma forma de contornar tais problemas é tentar modificar a superfície das nanopartículas. O aumento da resistência interfacial pode ser favorecido pela simples modificação da superfície da carga inorgânica (ARMENTANO, DOTTORI, *et al.*, 2010) e permite moldar as propriedades do biomaterial, obtendo propriedades melhoradas (SZUBERT, ADAMSKA, *et al.*, 2014).

Inúmeras vantagens são atribuídas a nanopartículas quando ocorre modificação de sua superfície. As mais comuns são: prevenção do processo de dissolução a valores de pH baixos, prevenção de um possível processo inflamatório em tecidos vivos, prevenção de aglomeração, melhoramento da estabilidade coloidal de sistemas que os contem, aumento da bioatividade, auxilia na biocompatibilidade, na não ativação do sistema fagocitário, aumento da permanência *in vivo*, bem como auxilia/melhora/preveni conjugação e/ou formação de ligações químicas fortes entre as partículas e outras matrizes (ZHOU, LEE, 2011; BAREIRO, SANTOS, 2014; KANGO, KALIA, *et al.*, 2013; LEE, LOO, *et al.*, 2014; FERESHTEH, MALLAKPOUR, *et al.*, 2015; XIANMIAO, YUBAO, *et al.*, 2009).

Nanopartículas inorgânicas sofrem modificações em suas superfícies, geralmente, pela inserção de moléculas de surfactantes ou outros agentes modificadores, de acoplamento, ácidos graxos, ácidos policarboxilados e seus sais, e etanol, com alta interação química com a partícula e promove uma forte repulsão entre elas (KANGO, KALIA, *et al.*, 2013; FERESHTEH, MALLAKPOUR, *et al.*, 2015).

A modificação da superfície de uma partícula está associada à alteração em suas propriedades físicas ou químicas, em geral, propriedades mecânicas. Modificações de partículas de HAP, a exemplo, ocorrem principalmente com a finalidade de aumentar a estabilidade coloidal, reduzir a absorção de água e melhorar as propriedades mecânicas (FANG, FENG, 2014; BAREIRO, SANTOS, 2014).

Alterações nas propriedades mecânicas de arcabouços contendo partículas de HAP foram observadas por FANG, FENG (2014) em seu trabalho. Neste, o aumento da substância APTES ocasionou aumento significativo da propriedade e da dispersão das partículas de HAP na matriz de PLLA. BAREIRO, SANTOS (2014) propuseram modificar a HAP com a adição de diferentes agentes químicos (álcool dodecila e sílica), e avaliar a influência destes agentes na estabilidade coloidal e na química de superfície. Eles observaram que a estabilidade coloidal estava inteiramente interligada a modificação da superfície, pois a incorporação do álcool propiciou uma maior estabilidade em etanol e

o revestimento de sílica, e impediu a dissolução completa da cerâmica em ambientes ácidos. Outro trabalho da literatura reporta que a modificação da superfície da HAP com silício em compósitos, por exemplo, favorece o processo de compatibilidade celular com um aumento da fixação de células, da viabilidade e da proliferação quando comparados a matriz pura, ou seja, na ausência da HAP modificada (THEIN-HAN, SHAH, *et al.*, 2009).

A modificação pode ocorrer através de diferentes processos, entre biológicos, físicos, químicos e até mecânicos: enxertia de polímeros, por tratamentos químicos, adsorção de dispersantes, imobilização física e química por proteínas, e modificação *in situ* (LEE, LOO, *et al.*, 2014; SZUBERT, ADAMSKA, *et al.*, 2014; KANGO, KALIA, *et al.*, 2013; FERESHTEH, MALLAKPOUR, *et al.*, 2015). No tratamento químico, grupos funcionais químicos da própria nanopartícula servem como pontos de ancoramento para formar ligações com grupos químicos do agente modificador (KANGO, KALIA, *et al.*, 2013; FERESHTEH, MALLAKPOUR, *et al.*, 2015). Na enxertia, a superfície é envolta por polímeros que alteram sua topografia e funcionalidade química, e produz um material mais estável (SZUBERT, ADAMSKA, *et al.*, 2014). Neste último, o conjunto formado por nanopartículas inorgânica e os blocos poliméricos são considerados compósitos (KANGO, KALIA, *et al.*, 2013).

Modificar a superfície *in situ* ocorre simultaneamente à produção das partículas, incluindo métodos de micelas reversas, decomposição térmica e polióis. A adsorção de dispersantes é o método mais simples, e pode ocorrer em ambientes aquosos, e usado quando o modificador é solúvel em solvente orgânico (KANGO, KALIA, *et al.*, 2013).

A imobilização física por proteínas ocorre quando as proteínas são ancoradas na superfície, na qual estabelece interações não covalentes (eletrostática, van der Waals, ligações de hidrogênio, e interações hidrofóbicas). Já a imobilização química baseia-se na alteração da energia de superfície, carga e composição do material. Ela ocorre através da imobilização covalente de grupos orgânicos, íons, processo sol-gel e tratamento ácido-alcalino (LEE, LOO, *et al.*, 2014).

A modificação da superfície com o ácido esteárico (AE) pode ser uma abordagem eficaz para resolver problemas potenciais em biomateriais, pois este é um tipo de ácido graxo saturado presente no corpo humano e não tem toxicidade (ZHANG, LI., *et al.*, 2012). A modificação ocorre pela inserção de cadeias de hidrocarbonetos na superfície da HAP (HOTZA, 1997), o que melhora os problemas ocasionados pela técnica de obtenção da hidroxiapatita (aglomeração).

O ácido esteárico (AE) é um ácido biocompatível e biodegradável, excretado pelo organismo através do metabolismo natural do corpo (LI, WENG, 2008). As propriedades da HAP podem ser melhoradas com a introdução do AE em sua superfície, facilitando a interação desta apatita a compostos orgânicos para a formação de compósitos bioativos.

LI, WENG (2008) e NUNES, VALERIO, *et al.* (2011), em trabalhos independentes, mostram que modificações da superfície são comumente utilizadas para melhorar propriedades dos materiais como as cerâmicas de apatita.

ZHANG, LI, *et al.* (2012) utilizaram o AE no recobrimento de partículas de HAP para revestimento de próteses de titânio. Eles observaram que o compósito HAP-AE, obtido por adsorção física, atenuou o processo corrosivo das próteses de titânio quando comparados ao revestimento de HAP apenas.

Deste modo, a modificação da superfície da hidroxiapatita através da inserção do AE poderá promover uma melhora na interação interfacial entre seus sítios reativos e a quitosana, e assim melhorar a biocompatibilidade do arcabouço proposto no trabalho.

II.6. CARACTERIZAÇÕES

II.6.1. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE DESACETILAÇÃO DA QUITOSANA

A razão molar entre o número de grupamentos amino e grupos amidas livres (D-glucosamino e *N*-acetil-D-glucosamino), contidos na estrutura química da quitosana, é

caracterizado como Grau Médio de Desacetilação (GD), e é expresso em porcentagem (THEIN-HAN, MISRA, 2009). A quitosana somente é formada quando o GD atinge um determinado valor, de no mínimo de 60% unidades D-Glucosamino (DIMZON, EBERT, *et al.*, 2013; CROISIER, JÉRÔME, 2013).

O GD é importante na definição das características essenciais da quitosana pois está diretamente relacionada a ligações de hidrogênio existentes no biopolímero, o que interfere em parâmetros como solubilidade, estrutura, viscosidade, atividade biológica e reatividade (PIGHINELLI, KUCHARSKA, 2013; ELSABEE, ABDU, 2013; BEIL, SCHAMBERGER, *et al.*, 2012; PILLAI, PAUL, *et al.*, 2009). A acetilação da quitosana em meio hidro alcóolico leva a modificação seletiva de grupos amino livres e é responsável pelo início e processo de gelatinização de suas soluções (PIGHINELLI, KUCHARSKA, 2013; LIU, CHEN, *et al.*, 2014).

A complexação com substâncias ativas biologicamente (proteínas e peptídeos), a característica de mucoadesividade, a degradabilidade em meio fisiológico, a cristalinidade de sua estrutura e a atividade antimicrobiana associadas a quitosana são dependentes do GD, o qual afeta diretamente o comportamento físico-químico e biológico de suas soluções (BEIL, SCHAMBERGER, *et al.*, 2012; CROISIER, JÉRÔME, 2013; LIU, CHEN, *et al.*, 2014; ELSABEE, ABDU, 2013).

Inúmeras técnicas podem ser utilizadas na avaliação deste parâmetro, incluindo, a espectroscopia de infravermelho, espectroscopia de RMN, espectroscopia de ultravioleta, calorimetria exploratória diferencial, dicroísmo circular (BEIL, SCHAMBERGER, *et al.*, 2012), degradação enzimática, e métodos titulométricos, como o coloidal, condutimétrico e potenciométrico (CROISIER, JÉRÔME, 2013).

A titulação condutimétrica foi utilizada com o intuito de determinar a quantidade de grupamentos aminos livres protonáveis existente na estrutura química da molécula de quitosana, e assim, definir o grau de desacetilação (GD) (CZUBENKO, PIEROÓG, *et al.*, 2013).

II.6.2. ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ (EDL)

Determinar e controlar o tamanho de partículas tornou-se um procedimento importante no domínio de processos de materiais. Diversas são as metodologias e os equipamentos utilizados nesta investigação, a escolha deverá ser conciliada com as características de cada material. Usualmente, é necessária a associação de técnicas experimentais diferentes para determinar com maior precisão a faixa de tamanho (BARABÁS, CZIKÓ, *et al.*, 2013).

O espalhamento dinâmico de luz (EDL) permite estimar o tamanho de partículas, ou de aglomerados de partículas, medindo seu raio hidrodinâmico em suspensão. No meio disperso, as partículas ou moléculas deslocam-se em movimentos aleatórios em consequência do choque entre partículas da amostra e do solvente. A este fenômeno dá-se o nome de *Movimento Browniano* (ZHOU, QI, *et al.*, 2015).

Quando um feixe de luz laser é incidido sob uma dispersão por um determinado tempo, a luz colide com as partículas em suspensão e é espalhada por todas as direções. Colocando um detector em uma determinada posição angular em relação ao feixe incidente, este registrará intensidade de luz variável dependendo do fato da luz espalhada por diversas partículas sofrerem interferência construtiva (intensidade máxima) ou destrutiva (intensidade mínima). Por encontrar-se em constante movimento (Movimento Browniano), diferentes níveis de flutuação da radiação espalhada da luz são observados e, a análise dessas flutuações de intensidade resulta na velocidade do Movimento Browniano. Os distintos tamanhos de partículas irão refletir nos níveis de flutuação da intensidade da luz espalhada, já que partículas de pequenos tamanhos apresentam uma velocidade maior de movimentação, difundindo-se pelo solvente rapidamente, quando comparado a partículas grandes (LOTYA, RAKOVICH, *et al.*, 2013; ZHOU, QI, *et al.*, 2015).

A mobilidade em solução é dependente da viscosidade do meio e do raio de hidratação da amostra tornando crucial a escolha correta do meio dispersante para um resultado mais fidedigno possível.

Sendo assim, o tamanho de partícula pode ser estimado usando a relação de Stokes-Einstein (MALVERN, 2014) (Equação II.1):

$$D = \frac{KT}{6\pi\eta R_H}$$

(Equação II.1)

no qual, D o coeficiente de difusão, K a constante de Boltzmann, T a temperatura, η a viscosidade, e R_h o raio hidrodinâmico da partícula.

Além do mais, o posicionamento do feixe de luz e do detector é importante para uma medida que represente significativamente a população de amostra. O ângulo de espalhamento da luz pode ser afetado, dentre outros fatores, pelo formato das partículas. Os modelos mais simples e tradicionais consideram partículas esféricas em Movimento Browniano em um solvente ideal e isotrópico para a análise da flutuação da intensidade da luz espalhada em função do tempo. Em uma suspensão contendo partículas de diferentes formas e tamanhos a interpretação dos dados não é tão simples. Deve-se levar em conta também que a distribuição de tamanhos se refere ao raio hidrodinâmico ou raio de giro hidrodinâmico, que inclui além do raio propriamente dito da partícula, a camada de solvatação que é arrastada pela partícula ao se deslocar no fluido. Isso significa que a técnica de EDL permite distinguir o estado de aglomeração das partículas.

II.6.3. DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DRX)

Ao atingirem um material, os raios X sofrem diferentes processos de interação com a matéria. Uma parte significativa dos raios X incidentes são espalhados de forma elástica, no qual não há perdas de energia, por elétrons que estão ao redor do núcleo atômico que compõe a célula unitária e este espalhamento pode ser nomeado de espalhamento coerente (ANGHELINA, BRATU, *et al.*, 2014). Quando o arranjo estrutural dos átomos que compõem o material é organizado de forma ordenada, e apresentarem espaçamento interatômica compatível com o comprimento de onda da radiação incidente, as relações entre os espalhamentos tornam-se periódicas e visualizadas em ângulos variáveis. A característica primordial na difração de ondas de qualquer comprimento está na distância entre os centros espalhadores. Quando estes centros espalhadores estão periodicamente distribuídos em planos cristalinos no volume do material, os feixes de raios X espalhados sofrem interferência construtiva a depender desta distância interplanar, d , da posição angular onde se coloca o detector e do comprimento de onda da radiação incidente, λ . A Lei de Bragg expressa estas condições matematicamente:

$$n\lambda = 2d\sin\theta$$

(Equação II.2)

onde, λ , refere-se ao comprimento de onda, d , a distância entre os planos, n , a ordem de difração, e θ , o ângulo de incidência do feixe em relação aos planos cristalinos em questão.

Fatores como desvio do feixe em relação ao monocromador, a geometria de difração e a divergência do feixe incidente conduzem a alterações de alargamento de picos na difratometria de raios X. A intensidade de difração destes raios sofrerá influência de diversos fatores, entre eles: (1) transparência da amostra; (2) alinhamento

do feixe; (3) fatores instrumentais; (4) defeitos da amostra; (5) tamanho das partículas; (6) fonte de raios X (ANGHELINA, BRATU, *et al.*, 2014).

II.6.4. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (IVTF)

A seção do espectro eletromagnético que se estende de 0,7 a 1000 μm , situado entre comprimentos de onda (λ) maiores do que a luz visível e menores do que as micro-ondas, é denominada radiação infravermelha (RIV) e pode ser subdividida em infravermelho próximo (0,7-3 μm), médio (3-6 μm), distante (6-15 μm) e extremo (15-1000 μm) (INEP, 2015). A RIV é uma radiação não ionizante de baixa energia, não suficiente para a promoção da excitação eletrônica, mas para promover a vibração de ligações do tipo covalentes que unem átomos ou grupos de átomos.

Em geral, os compostos orgânicos e inorgânicos que possuem ligações covalentes, quando excitadas por uma fonte de radiação eletromagnética, absorvem energia na região do infravermelho em várias frequências. A energia absorvida é quantizada, ou seja, as vibrações das ligações ocorrem após a absorção da radiação em certas frequências, e tem a eles associados um certo comprimento de onda. Isto só ocorre quando um material absorve radiação IV com energia particular (certo comprimento de onda ou frequência, pois, $\Delta E = h\nu$). Deste modo, as moléculas após absorvem a RIV são excitadas até atingir o maior estado energético associados a modos de vibração característicos, tal como massas presas por molas sofrendo deformações periódicas (SILVERSTEIN, WEBSTER, *et al.*, 2006).

A absorção de radiação infravermelho é um processo que ocorre fundamentalmente por interação do campo elétrico oscilante da radiação eletromagnética com as cargas elétricas do meio e, portanto, os modos vibracionais somente serão excitados quando o momento dipolo da molécula altera-se. Partindo deste pressuposto, as vibrações simétricas dos quatro átomos de hidrogênio do metano

(CH₄) não é um modo de vibração que possa ser excitado por absorção da RIV pois não há alteração do momento dipolo.

O estado vibracional das ligações pode ser classificado de acordo com a forma que se deformam, podendo ser do tipo estiramentos axiais: simétrico e assimétrico; ou deformações angulares: simétrica no plano (tesoura), assimétrica no plano (balanço), simétrica fora do plano (torção) e assimétrica fora do plano (abano), entre outros.

As informações oriundas da incidência da RIV sob uma amostra são ilustradas como um gráfico que relaciona a intensidade da absorção versus o número de onda da radiação incidente onde o número de onda é o inverso do comprimento de onda da radiação incidente. A região de interesse para análises situa-se entre 4000 e 400 cm⁻¹, e subdividido em uma região de mais alta frequência (4000 a 1300 cm⁻¹), e outra região conhecida como impressão digital (1300 e 900 cm⁻¹). A probabilidade de duas ou mais substâncias apresentarem o mesmo espectro é extremamente mínima, tal razão, o espectro de IV é chamado a “impressão digital” da molécula.

Os parâmetros a serem analisados em um espectro de IV são a posição (frequência de absorção) e a intensidade da absorção (expressa em % de transmissão da radiação eletromagnética que atravessa a amostra, e dependente da polaridade, do número de ligações e da concentração da amostra).

Embora o espectro de IV caracterize uma substância, alguns grupos de átomos absorvem energia usualmente numa mesma região de frequência, apresentando pouca dependência com a estrutura da molécula. Assim, a presença de certos picos/bandas (característicos do processo de absorção de energia quantizada) permite inferir dados a respeito de moléculas de estruturas desconhecidas ou não identificadas.

Usualmente, a técnica é utilizada na identificação de grupos químicos de amostras desconhecidas, verificar interações químicas entre moléculas diferentes e a formação de novos compostos. Porém, utilizações não usuais, tais como a detecção de células e tecidos malignos para avaliação da progressão/regressão de tumores tem sido

aplicada a espectroscopia na região do infravermelho (ZELIG, MORDECHAI, *et al.*, 2011).

II.6.5. TERMOGRAVIMETRIA (TG/DTG)

A termogravimetria ou análise termogravimétrica (TG) é uma medida que utiliza a observação da variação de massa de uma dada amostra ao mesmo tempo que esta é submetida a variações programadas e controladas de temperatura (ANTUNES, 2003).

A medida é expressa através da relação da variação da massa em função da temperatura ou do tempo, e permite ao analista inferir informações com finalidades quantitativas, sobre a estabilidade térmica da amostra, a composição e a estabilidade de compostos intermediários e do produto final. A área diretamente proporcional a variação de massa, permite a partir da altura do pico a qualquer temperatura, obter a razão de variação de massa naquela temperatura.

Diferentes propriedades físicas e químicas podem ser extraídas da curva de TG. A quimiossorção, decomposição, dessolvatação, degradação reductiva ou oxidativa, e reações de estado sólidos são exemplos de fenômenos químicos observados através das curvas de TG. Dentre os físicos, a desidratação, vaporização, sublimação, adsorção, dessorção e absorção são ressaltados. No estudo de identificação de compostos e de reações químicas, o TG pode ser aplicado para a separação de reações sobrepostas, cálculo da variação de massa em reações sobrepostas, distinção entre diferentes eventos térmicos, partindo do pressuposto que cada substância possui uma curva característica de perda/ganho de massa no TG.

Uma forma de melhor identificar e separar os eventos térmicos a partir das curvas de TG é aplicando a derivada da curva de variação de massa em função do tempo (DTG), podendo ser em função do tempo ou temperatura, tal como no TG. A curva apresenta-se como uma série de picos obtidas em função das etapas de decomposição térmica. Cada patamar horizontal na curva da TG está relacionado com

valores zero na curva DTG. Os picos na curva de DTG são associadas a pontos de inflexão na curva TG o qual está associado a temperatura onde a perda de massa ocorre mais rápido para aquele evento. As curvas DTG são auxiliares das curvas TG, e ambas fornecem informações pertinentes sobre a composição da amostra analisada.

Um equipamento de TGA é composto de um forno, de balanças calibradas, um suporte para a amostra, sistema de vazão de gases, amplificadores, detectores e filtros. A calibração do conjunto é necessária para que a medida se torne a mais fidedigna possível.

II.6.6. POROSIDADE POR IMERSÃO

A porosidade é um parâmetro físico baseado na presença de poros (abertos ou fechados) e importante na confecção de estruturas tridimensionais de uso biológico. Poros abertos estão associados as propriedades tais como permeabilidade e ação catalítica entre outros. O controle da migração, adesão e proliferação de células nas estruturas bem como, o transporte de nutrientes e resíduos é regido pela presença de poros abertos e sua morfologia (SHIMOJO, PEREZ, *et al.*, 2012; HOUMARD, FU, *et al.*, 2013; SAIZ, ZIMMERMANN, *et al.*, 2013). A alta porosidade usualmente significa alta razão entre área e volume de superfície, e favorece a adesão celular no arcabouço e regeneração do tecido ósseo (JIN, KIM, *et al.*, 2012; ARMENTANO, DOTTORI, *et al.*, 2010).

Considerando-se que o aumento da porosidade pode comprometer a integridade física, uma elevada porosidade de um arcabouço também influi significativamente nas propriedades mecânicas deste e estas propriedades mecânicas dependem tanto da quantidade de poros abertos como da de poros fechados. Materiais altamente porosos podem ter seu desempenho mecânico comprometido, tornando-se frágeis a compressões mecânicas, propriedades requeridas para biomateriais de reparo ósseo (HOUMARD, FU, *et al.*, 2013; FANG, FENG, 2014; WEGST, BAI, *et al.*, 2015).

HOUARD, FU, *et al.* (2013) demonstraram esta hipótese quando avaliaram a influência da composição nas propriedades mecânicas em função da porosidade. Eles observaram que o aumento das propriedades mecânicas estava associado a redução do volume de poro do arcabouço de HAP e β -TCP.

Ademais, a estrutura porosa de arcabouços pode imprimir perfis diferenciados de absorção de líquidos. O grau de porosidade (associada a poros abertos) da estrutura apresenta-se como fator determinante na propriedade de absorção de fluidos. Materiais altamente porosos tem a capacidade de retenção de líquidos maior do que aqueles de baixa porosidade.

Partindo destes pressupostos, é de crucial importância o desenvolvimento de suportes porosos com porosidade apropriada para o desempenho em sistemas biológicos. Diversas técnicas de processamento podem originar materiais altamente porosos, incluindo, evaporação de solvente, lixiviação, *foam mat*, *electrospinning*, prototipagem rápida, separação de fases termicamente induzidas, e a liofilização (ARMENTANO, DOTTORI, *et al.*, 2010). A escolha da técnica permitirá obter arcabouços tridimensionais de porosidade variável, entre 24 e 96%, com controle de tamanho de poro e formação dos canais. Estes, por sua vez, são influenciados pelo tamanho das partículas, do processo de aeração da suspensão ou uso de suportes de direcionamento de cavidades (FU, SAIZ, *et al.*, 2013).

A liofilização é uma técnica de secagem utilizada na indústria alimentícia para a desidratação de alimentos para a sua conservação. Seu princípio está na remoção de solventes congelados através da sublimação, preservando as características do material que seriam perdidas se esta secagem ocorresse por intermédio de temperaturas elevadas. Para a confecção de arcabouços tridimensionais, ela é uma técnica relativamente nova, mas tornou-se bastante utilizada por criar uma orientação das cavidades porosas.

II.6.7. INTUMESCIMENTO

Polímeros hidrofílicos tem a capacidade de reorganizar sua estrutura após absorver fluidos, devido a sua natureza flexível. Tais polímeros são conhecidos como formadores de hidrogéis, e são capazes de intumescer em água ou em fluidos biológicos, tornando-se mais elástico. Eles podem absorver grandes volumes (geralmente, superior a 20% de seu peso inicial) sem que, mesmo sob pressão, este líquido seja removido (CZUBENKO, PIEROÓG, *et al.*, 2013; SAMANTA, RAY, 2014; SWARBRICK, 2007).

Inúmeras propriedades do hidrogel, e seus derivados, são influenciados pelo teor aquoso durante o intumescimento como, permeabilidade, propriedades mecânicas, propriedades de superfície e biocompatibilidade. A consistência flexível e rugosa, e baixa tensão interfacial com fluidos mostram a importância de se avaliar tal parâmetro no desenvolvimento de biomateriais (SWARBRICK, 2007). Quando desidratado, eles apresentam um aspecto e vão adquirindo forma após o intumescimento, aumentando o volume e tornando-se flexíveis e elásticos até alcançar um estado de equilíbrio. No estado intumescido, o material pode auxiliar a absorção de culturas celulares, transporte de solutos, propriedades difusoras, a passagem de nutrientes e de substâncias ativas, tais como fármacos, através do material (CZUBENKO, PIEROÓG, *et al.*, 2013; KUMAR, SRINIVASAN, *et al.*, 2011).

A porcentagem de líquido absorvido pode ser moldada alterando a natureza química do material ou combinando as propriedades de um conjunto de componentes (orgânicos e inorgânicos), como os compósitos (SALCEDO, AGUZZI, *et al.*, 2012). Isto ocorre com um ajuste do nível de interação química ou física entre o material e a água (CROISIER, JÉRÔME, 2013).

Vários materiais, de origem natural ou sintético, podem dar forma a hidrogéis, inclusive a quitosana (CZUBENKO, PIEROÓG, *et al.*, 2013). A alta capacidade dilatante e pobres propriedades mecânicas fazem com que estruturas advindas da quitosana

sejam facilmente deformáveis (SALCEDO, AGUZZI, *et al.*, 2012). Por si só, a quitosana é capaz de formar hidrogéis, sem a adição de aditivos. Na quitosana, o processo de formação do hidrogel ocorre após a neutralização de carga positivas que interagem com moléculas carregadas negativamente, como os fosfatos e sulfatos, por meio de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (Figura III.1) (CROISIER, JÉRÔME, 2013).

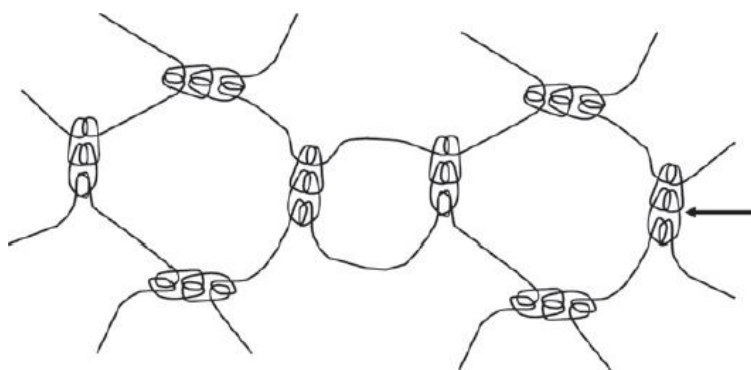


Figura II.7. Representação esquemática da interação química na quitosana para a formação do hidrogel. A seta indica as interações. (Fonte: CROISIER, JÉRÔME, 2013)

O grau de reticulação química/física e associações com outros componentes, através de ligações cruzadas, podem modular o intumescimento (PENG, LI, 2014; CZUBENKO, PIEROÓG, 2013). O número de ligações cruzadas e reticulações diminuem a disponibilidade de íons NH_3^+ , protonados na solubilização da quitosana. Sendo assim, o GD e a pureza da quitosana serão determinantes na formação e intumescimento do hidrogel.

Além do mais, a forma física apresentada pelo hidrogel influencia na propriedade de absorção de líquidos. Materiais esponjosos apresentam uma alta absorção e é dependente do grau de porosidade de sua estrutura, ou seja, materiais altamente porosos tem a capacidade de retenção de líquidos maior do que aqueles de baixa porosidade, para o caso de poros abertos.

II.6.8. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A caracterização microestrutural de um material pode ser conseguido através de técnicas de análises de imagens. As microscopias são uma delas, e permitem ao observador inferir dados sobre tamanhos, formas, distribuição das unidades estruturais e caracterização de fases presentes em um determinado material, utilizando com parâmetros o limite de resolução (menor distância entre dois pontos distinguíveis), contraste (capacidade de distinguir traços em um plano de fundo) e profundidade de campo (espessura da amostra). As microscopias eletrônicas destacam-se por serem versáteis, pela resolução, qualidade e facilidade na interpretação da imagem e podem ser obtidas sob vácuo (MALISKA, 2014; PEIXOTO, 2011).

A microscopia eletrônica baseia-se na interação de um feixe de elétrons com um material que podem atingir níveis profundos, caracterizando assim, os diferentes tipos de microscopias eletrônicas.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é utilizada rotineiramente na análise microestrutural de materiais sólidos por conseguir imagem com grande profundidade de campo, quase tridimensionais, além de conduzir análise de amostras de espessuras variadas, em vácuo, de resolução de 2-5 nm (20-50 Å) e aumento entre 20 e 1.000.000x. Dentre as vantagens de se utilizar a MEV está a análise composicional elementar, detecção da morfologia da superfície do material e a facilidade de preparação da amostra. Entretanto, a necessidade de recobrimento metálico, em certos casos, e a necessidade da utilização de vácuo limita o uso desta técnica.

O princípio da técnica consiste basicamente na produção de um feixe de elétrons a partir de um canhão de elétrons na coluna ótico-eletrônica (formado pelo canhão de elétrons e pelo sistema de lentes eletromagnéticas). O feixe de elétrons é produzido em energia e quantidade suficiente para ser detectado nos detectores posicionados estrategicamente no microscópio eletrônico. Antes da detecção, o feixe é demagnificado por várias lentes eletromagnéticas, ou seja, o feixe é colimado e focado a um pequeno

ponto da amostra. Quando atinge a superfície da amostra, o feixe interage com os átomos da superfície, e os elétrons, então, sofrerão modificação da sua velocidade inicial e esta alteração pode ser tanto na direção como na magnitude.

Estas interações podem ser elásticas e inelástica, e interferirão na resposta apresentada, resultando na excitação ou liberação dos elétrons das diversas camadas eletrônicas do átomo da superfície da amostra, produzindo imagens oriundas de elétrons secundários e imagens de elétrons retroespalhados. Poderá ocorrer a emissão de raios X da amostra durante a ejeção de elétrons sob a superfície da amostra, fornecendo dados de composição química elementar daquela região irradiada pelo feixe. Tal procedimento permite ao analista identificar e mapear elementos químicos presentes na área de varredura.

II.6.9. ESPALHAMENTO DE RAIOS X A BAIXOS ÂNGULOS (SAXS)

A forma com que uma fonte de raios X interage com a matéria pode levar a uma diversidade de informações importantes, a respeito da estrutura local e de formação do material. Uma técnica na qual se aplica de forma analítica o feixe de raios X, o espalhamento de raios X a baixos ângulos, SAXS, tem sido bastante utilizada na caracterização estrutural de materiais sólidos e líquidos em escala nanométrica (SILVA, 2008). No SAXS, a radiação incidente é espalhada de forma elástica através da amostra e resulta em uma radiação cuja informações estruturais das partículas dispersas podem ser derivadas a partir da distribuição da intensidade do feixe disperso em menores ângulos de espalhamento (GRAEWERT, SVERGUN, 2013; PETOUKHOV, SVERGUN, 2013; SANZ, GIDLEY, *et al.*, 2015).

As informações que podem ser extraídas de medidas de SAXS são o tamanho, distribuição e estrutura de objetos espalhadores, mesmo que estes não estejam ordenados de forma bem organizada. Estes objetos espalhadores podem ser cristalinos ou não-cristalinos, por exemplo, soluções de macromoléculas, sistemas estabilizados

por tensoativos, nanocompósitos, ligas, polímeros sintéticos e naturais, biomateriais, filmes híbridos, entre outras várias estruturas (DONG, BOYD, 2011).

Uma ampla variedade de tamanhos moleculares, entre kDa e GDa, podem ser analisados através do SAXS, e associados a estudos experimentais em ambientes extremos, como sob alta pressão e ou criogenia, permitem ao analista controlar diferentes níveis de organização estrutural em sistemas hierárquicos semelhantes aos encontrados em sistemas biológicos. *In situ*, o SAXS fornece informações únicas sobre os processos, em função do tempo e da dinâmica de como ocorrem (GRAEWERT, SVERGUN, 2013; DONG, BOYD, 2011; PETOUKHOV, SVERGUN, 2013).

Em um ensaio de SAXS usual, ao se irradiar uma amostra com um feixe de raios X monocromático, o espalhamento da radiação na região angular próxima a do feixe transmitido é observado. As macromoléculas são, então, orientadas de forma aleatória em solução e seu padrão de espalhamento é registrado por um detector de raios X (Figura III.3). Este espalhamento ocorre devido a heterogeneidade na distribuição eletrônica das estruturas em solução (PETOUKHOV, SVERGUN, 2013; SANZ, GIDLEY, *et al.*, 2015).

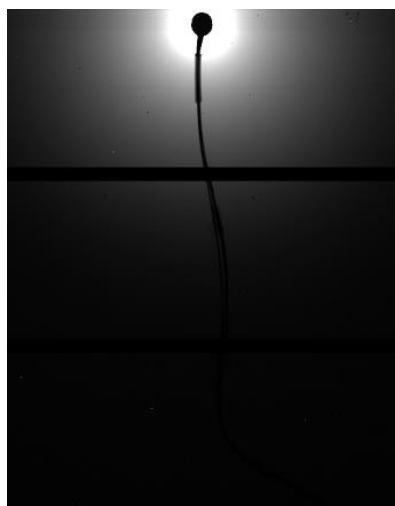


Figura II.8. Registro do espalhamento do feixe de raios X por um detector. (Fonte: Própria do autor)

Quando tem-se uma partícula de tamanho e forma aleatória, a intensidade do feixe espalhado $I(q)$ é proporcional a forma da partícula $P(q)$, sendo q o vetor de espalhamento (DONG, BOYD, 2011) (Figura III.4).

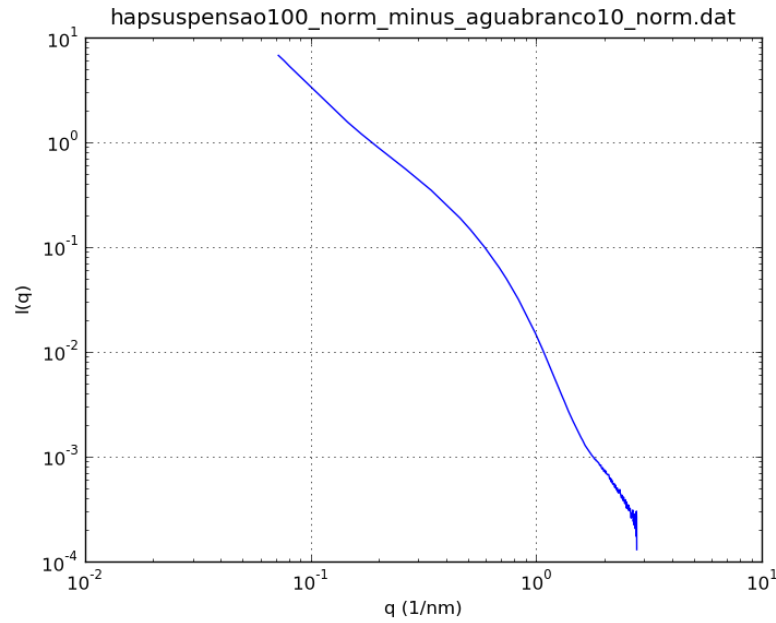


Figura II.9. Gráfico típico de espalhamento de raios X a baixos ângulos. (Fonte: Própria do autor)

Quando as partículas se encontram em suspensão diluída, a intensidade do vetor de espalhamento I é semelhante para todas as partículas em dispersão e depende exclusivamente do ângulo 2θ e do fator de forma (PETOUKHOV, SVERGUN, 2013; SANZ, GIDLEY, *et al.*, 2015). Para verificar e eliminar a influência do solvente ou agente dispersivo, é medido também o espalhamento do solvente, ou branco, e subtraído da intensidade das amostras. A intensidade resultante é a soma das contribuições de cada partícula, de modo que, para n partículas distribuídas ao acaso têm-se:

$$I(q) \propto \sum_n P_n(q) \quad \text{(Equação II.3)}$$

Para dispersões concentradas ou até mesmo, no estado sólido, as partículas interagem entre si e a organização local e sua geometria será refletido na intensidade de espalhamento. Para n partículas idênticas dispersas aleatoriamente em uma solução homogênea e concentrada, o vetor de espalhamento é descrito em função do fator de estrutura ($S(q)$) do todo:

$$I(q) = n \cdot P(q) \cdot S(q) \quad \text{(Equação II.4)}$$

Entretanto, quando há no sistema partículas de formas diversas, a distinção da contribuição dos fatores $P(q)$ e $S(q)$ será mais complexa.

Em uma curva típica de SAXS é possível detectar diversas regiões, como a região de Porod, para altos valores de q , e a região de Guinier, para baixos valores de q . Nestas regiões, ocorrem espalhamentos dos raios X a baixos ângulos (θ), e fornecem dados sobre a estrutura e morfologia das partículas (GRAEWERT, SVERGUN, 2013).

A massa molecular (MM) e seu raio de giro (R_g) são derivados a partir da inclinação da porção Guinier $\ln(I(s))$ versus s^2 , para baixos valores de s . Dados como o raio de hidratação das partículas em suspensão (V) e da superfície (S) podem ser obtidas usando-se a porção Porod da curva (DONG, BOYD, 2011; SANZ, GIDLEY, *et al.*, 2015). A distância entre os centros espalhadores ($d_{m\acute{a}x}$) pode ser extraído da curva de SAXS após uma transformada de Fourier (PETOUKHOV, SVERGUN, 2013).

II.6.10. TOMOGRAFIA DE RAIOS X UTILIZANDO FONTES DE RADIAÇÃO SINCROTRON (TCRS)

Acompanhar a evolução e o comportamento de biomateriais requerem técnicas cada vez mais produtivas e não destrutivas, e entender como dá-se a estruturação destes é um dos interesses do campo biomédico (ALMEIDA, SOARES, *et al.*, 2012).

Desde sua descoberta, os raios X têm sido utilizados para uma infinidade de análises, entre elas técnicas de aquisição de imagens.

Procedimentos usuais, como análise histológica e histomorfológica, comum em análises de tecidos duros como o ósseo, é desvantajosa, pois revelam informações simples, podem causar deformação da anatomia da amostra, além de apresentar-se em duas dimensões (NELDAM, PINHOLT, 2014; ALMEIDA, SOARES, *et al.*, 2012; STILLER, RACK, *et al.*, 2009).

A microscopia eletrônica de varredura é usada em procedimentos para avaliar a microestrutura e morfologia de diversos materiais. As imagens adquiridas por microscopia permitem visualizar estruturas heterogenias, tais como os compósitos, com ótima resolução (~10 nm), e com aumentos variáveis (20-1000000 x), e excelente análise da superfície do material. Entretanto, para uma análise transversal da amostra é necessária sua fratura, seja ela por criofraturas ou mecanicamente, o que deforma a microarquitetura, e usualmente apresenta-se em duas dimensões (NELDAM, PINHOLT, 2014).

Utilizar técnicas não invasivas e destrutivas, as quais promovem uma análise minuciosa da estrutura, preservando sua plasticidade e forma originais, tornou-se cada vez mais usual (NELDAM, PINHOLT, 2014; NOGUEIRA, ALMEIDA, *et al.*, 2012; ALESSIO, NOGUEIRA, *et al.*, 2014; ALMEIDA, SOARES, *et al.*, 2012). A tomografia de raios X, extensamente aplicada à área médica, tem sido utilizada em outros campos para a interpretação de estruturas internas de diversos materiais (MASCHIO, 1997; LNLS, 2014). Dentre as grandes vantagens do método é a boa resolução espacial, que permite uma maior magnificação da imagem, sem o efeito de penumbra geométrica.

Informações tridimensionais de toda a estrutura de um material podem ser obtidas através de diversas aquisições de imagens projetadas em diferentes direções utilizando a tomografia de raios X (STILLER, RACK, *et al.*, 2009; LNLS, 2014). O método consiste na conversão de raios X em luz visível com um cintilador (usado na transformação da radiografia em luz visível) e projetando-os em um CCD usando um

microscópio ótico de alta resolução. A imagem é produzida por feixes policromáticos de raios X, que atravessam diversas seções de um corpo de prova sob variação do ângulo, através da projeção do plano e utiliza-se um computador para a reconstrução destas seções para formação da imagem (LNLS,2014; NOGUEIRA, ALMEIDA, *et al.*, 2012).

As fatias radiográficas dependem da diferença de densidade de absorção de raios X de cada objeto espalhador posto perpendicular ao feixe (GILANI, BOONE, *et al.*, 2014). A qualidade da imagem dependerá do modo de interação deste feixe com a matéria. A reconstrução da imagem é baseada na determinação dos coeficientes de atenuação sob a amostra e de uma perspectiva matemática (ALESSIO, NOGUEIRA, *et al.*, 2014; NOGUEIRA, ALMEIDA, *et al.*, 2012).

A imagem é binarizada, e consiste na escolha de um valor limite que serve como base para os cálculos. Todos os *pixels*, que são a menor unidade de uma imagem, que tiverem um valor menor do que o limiar recebe o zero (0). Logo, as imagens apresentam-se em variações na escala de cores entre o branco e o preto, sendo o branco o de maior contraste (de maior densidade) e o preto de menor contraste (menor densidade) (NOGUEIRA, 2008). A técnica de contraste de fases, semelhante a tomografia, envolve o método de aquisição de imagens a partir da colocação de um detector a certa distância da amostra de modo a adquirir a radiação refratada que interferiu no feixe incidente. Este método tem sido indicado na avaliação de materiais de baixas densidades ou compósitos de composição semelhantes (LNLS, 2014). As diferentes fases do material podem ser distinguidas pela diferença na densidade, com uma dada precisão pelo tamanho do *voxel* (STILLER, RACK, *et al.*, 2009; NOGUEIRA, 2008) (Figura III.5).

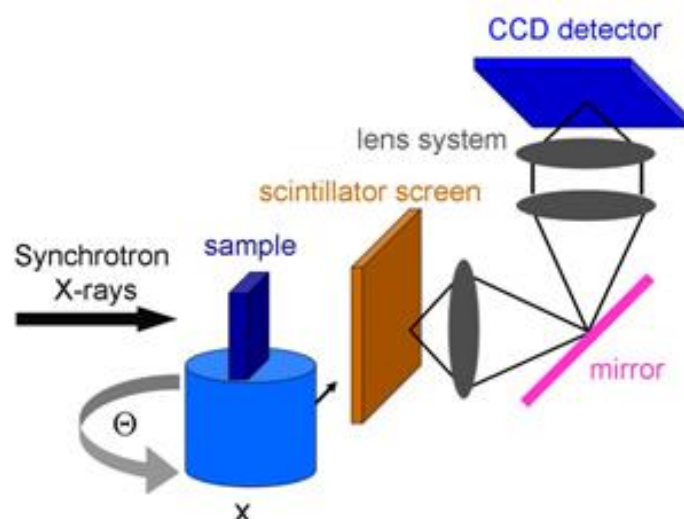


Figura II.10. Produção de imagens por tomografia de raios X. (Fonte: http://www.helmholtz-berlin.de/forschung/oe/em/werkstoffe/methoden/x-tomo/index_en.html)

Fontes de raios X convencionais, ou os chamados laboratoriais, produzem imagens com artefatos de feixe duro, penumbra geométrica, resolução de 10 μm , e sem contraste entre as fases constituintes. Ao associar a tomografia de raios X com fontes mais refinadas, como as fontes de luz síncrotron, tais problemas são contornados, e uma resolução espacial de um décimo de micrometro pode ser obtida (ALESSIO, NOGUEIRA, *et al.*, 2014; NELDAM, PINHOLT, *et al.*, 2014).

A utilização de radiação síncrotron na aquisição de imagens de tomografia é a mais sofisticada dentre as tomografias de raios X devido a sua alta resolução de campo e alto contraste. Fontes de luz síncrotron exibem um fluxo de fótons de diversas ordens de alta magnitude comparada as fontes de raios X laboratoriais usados para adquirir micro imagens 2D e 3D (STILLER, RACK, *et al.*, 2009).

As fontes síncrotron auxiliam no processo de obtenção de imagens com melhor resolução. Estas fontes produzem feixes que se propagam quase que paralelamente ao material, dado ao alto fluxo de fótons, coerência, colimação e resolução espacial suficiente para promover o contraste de fase. Permite visualizar objetos de diferentes

densidades, logo, apresenta-se como método para uma imagem qualitativa. Para NELDAM, PINHOLT, (2014), a tomografia de raios X usando sincrotron permite a observação de elementos finos estruturais de tecido mineralizados, bem como fronteiras entre células ósseas, diferenças na mineralização do tecido e as lamelas do osso trabecular.

II.6.11. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (CITOTOXICIDADE)

Durante o desenvolvimento de materiais para aplicações biomédicas, um possível efeito citotóxico apresentado por estes pode comprometer sua utilização em compartimentos biológicos. Bioensaios podem determinar a adequação do material a ser implantado, o qual deverá ser biocompatível com células humanas (ARIFIN, SULONG, *et al.*, 2014; SARAVANAN, NETHALA, *et al.*, 2011). Estes ensaios podem ser *in vivo* quanto *in vitro*, qualitativos ou quantitativos, a depender da resposta a ser avaliada (CHEN, CHEN, *et al.*, 2009). *In vitro*, a biocompatibilidade de um determinado material é mensurada após a imersão deste em fluido corporal simulado (SBF) sob condições que simulem o plasma sanguíneo, por tempos que podem ser de horas a semanas (ARIFIN, SULONG, *et al.*, 2014). Ao final do experimento, os materiais avaliados não deverão apresentar repostas negativas a viabilidade celular para ser indicados como potenciais implantes (SARAVANAN, NETHALA, *et al.*, 2011).

O nível de toxicidade de um candidato a biomaterial pode ser medido indiretamente, *in vitro*, através da determinação da atividade metabólica das células estudadas (CHEN, CHEN, *et al.*, 2009; PETER, BINULAL, *et al.*, 2010; PETER, GANESH, *et al.*, 2010). As células do sistema fagocitário, representadas por macrófagos murinos peritoneais, são utilizadas como método indireto para a detecção de citotoxicidade e apoptose celular. O método baseia-se na redução do agente MTT (um sal tetrazólico), por células vivas, em cristais de azul de Formazan através da atividade enzimática da desidrogenase mitocondrial (*mitochondrial redutase*) (Figura II.11)

(ALVES, GUIMARÃES, 2015; PETER, GANESH, *et al.*, 2010; SARAVANAN, NETHALA, *et al.*, 2011). A respiração celular é o parâmetro de medida, a qual é dependente proporcionalmente da quantidade de Formazan formada pelas células, e ao número de células que permanecem vivas na cultura (ALVES, GUIMARÃES, 2015). Os anéis tetrazólicos são clivados e transformam o agente MTT de um amarelo pálido para um azul escuro após a formação do azul de Formazan. Logo, a quantificação da redução do MTT a Formazan reflete, indiretamente, na viabilidade celular e auxilia a determinação desta (PETER, BINULAL, *et al.*, 2010; PETER, GANESH, *et al.*, 2010) e foi escolhido como parâmetro do comportamento biológico dos compósitos frente a uma cultura de células.

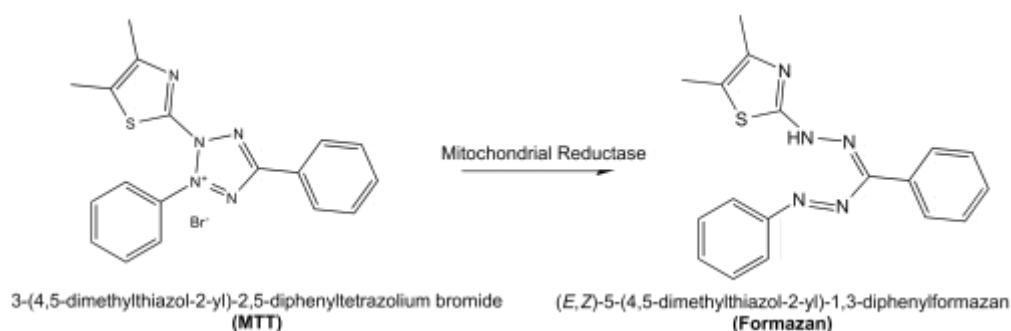


Figura II.11. Redução do agente MTT a azul de Formazan. (Fonte: http://www.digplanet.com/wiki/MTT_assay)

III. METODOLOGIAS

III.1 SÍNTESE E MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DA HIDROXIAPATITA (HAP)

A síntese da HAP ocorreu pelo processo de reação e precipitação por via úmida (PEIXOTO, 2011). O nitrato de cálcio $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$, a $0,167 \text{ mol.L}^{-1}$ (NEON®) fonte de íons Ca^{2+} , foi gotejado com a vazão de 2 mL.min^{-1} , sobre a solução doadora de íons fosfato (PO_4^{3-}), solução de fosfato de amônio difásico $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$, a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (NEON®). Durante o processo de precipitação e síntese da HAP, o controle do pH do meio reacional foi mantido em 10,4, através da adição de uma base de hidróxido de amônio $[\text{NH}_4\text{OH}]$ (NEON®) e, sob agitação magnética constante. A HAP passou por um processo de maturação, a qual envolveu o crescimento de cristais em um período de 24 horas posteriormente, foi calcinada a temperaturas de 600°C por 1 hora.

A modificação da superfície da HAP ocorreu inicialmente com a solubilização do AE, $[\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2]$, (Sigma Aldrich®), em uma quantidade de 7 e 15% (p/p) em função da massa de HAP (HAP-M7 e HAP-M15), em aproximadamente 160 mL de solvente orgânico (álcool etílico, $[\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}]$, Neon®) com a utilização de calor. A HAP foi adicionada a solução e a mistura AE/Etanol/HAP permaneceu em refluxo (Quimis) por 48 horas. Em seguida, todo o conteúdo do sistema em refluxo foi transferido para um Becker e permaneceu em agitação a temperatura ambiente até completa evaporação do solvente orgânico, ficando somente o pó da HAP-M (LI, WENG, 2008; NUNES, VALERIO, *et al.*, 2011).

III.2. PREPARAÇÃO DOS COMPÓSITOS

A quitosana (QAP e QBP) foi solubilizada em solução de ácido acético, formando um hidrogel polimérico de concentração de 1% (p/v). Objetivando otimizar a dispersão das partículas de HAP, e assim, evitar a sedimentação durante o processo de

congelamento das amostras, um agente de viscosidade (hidroxietilcelulose, HEC, PharmaNostra) foi adicionado ao hidrogel de quitosana em uma concentração de 0,3% (p/v). Sob agitação magnética constante, a HAP foi lentamente adicionada sob o hidrogel de Q/HEC e permaneceram em agitação durante 24 horas à temperatura ambiente. Decorrido o tempo de homogeneização, os compósitos foram congelados a -20°C por 48 horas e submetidos à liofilização (Liofilizador LS300 TERRONI®) durante 24 horas.

A obtenção dos compósitos de matriz polimérica obedeceu a razão de 66:34 (p/p) inorgânico/orgânico, razão fisiológica encontrada em ossos (PIGHINELLI, KUCHARSKA, 2013; MUZZARELLI, 2011). A Tabela III.1 abaixo descreve os diferentes grupos de amostras objeto de estudo deste trabalho.

Tabela III.1. Compósitos inorgânico/orgânico (66/34 p/p): composição dos compósitos na presença do HEC.

COMPÓSITOS	
CÓDIGO	COMPOSIÇÃO
Grupo I (GI)	HAP-P + QAP
Grupo II (GII)	HAP-P + QBP
Grupo III (GIII)	HAP-M15 + QAP
Grupo IV (GIV)	HAP-M15 + QBP
Grupo V (GV)	HAP-M7 + QAP
Grupo VI (GVI)	HAP-M7 + QBP

*HAP-P: hidroxiapatita pura obtida pela síntese de via úmida; HAP-M: hidroxiapatita com a superfície modificada pelo ácido esteárico; QAP: quitosana de alta pureza; QBP: quitosana de baixa pureza.

III.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA, QUÍMICA, MORFOLÓGICA E ESTRUTURAL

III.3.1. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE DESACETILAÇÃO DA QUITOSANA

A titulação condutimétrica foi utilizada com o intuito de determinar a quantidade de grupamentos aminos livres protonáveis existente na estrutura química da molécula

de quitosana, e assim, definir o grau de desacetilação (GD) (CZUBENKO, PIEROÓG, *et al.*, 2013).

Uma quantidade conhecida de cada amostra [100 mg, da quitosana de Alta Pureza (AP) (Sigma Aldrich®) e de Baixa Pureza (BP) (Polymar Brasil®)] foi dispersa em uma solução de ácido clorídrico [HCl] ($0,05 \text{ mol.L}^{-1}$), (Synth®), sob agitação magnética constante por 24 horas. Seguiu-se, então, a titulação das amostras com solução de hidróxido de sódio, [NaOH] ($0,0986 \text{ mol.L}^{-1}$), (Synth®); à temperatura ambiente. As variações de condutância durante a titulação foram medidas por condutivímetro Ion Com 500, Portable Series Version number: MULT-01050801.

III.3.2. ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ (EDL)

O tamanho e a distribuição das partículas de HAP, com e sem modificação de superfície (HAP-P, HAP-M7 e HAP-M15), foi mensurado através do EDL, considerando-se em primeira aproximação, que todas as partículas são esféricas (e posteriormente confirmadas por microscopia), e os resultados foram ilustrados graficamente no qual o eixo Y denota o número de partículas ou a intensidade relativa da luz incidente em função do raio de giro. É importante salientar que a escolha destas duas variáveis para representar os mesmos conjuntos de medidas não é fortuita e foi feita considerando que a intensidade de espalhamento é proporcional ao raio da partícula à sexta potência e o número de partículas é diretamente comparável a distribuição real da quantidade de partículas. No entanto, a distribuição em termos de intensidade de luz é mais próxima do que é realmente medido no EDL enquanto que a distribuição em termos de número de partículas é calculada desta primeira fazendo certas hipóteses sobre o espalhamento de partículas pequenas. Outro motivo para exibir ambas as distribuições é que, como a intensidade é proporcional ao raio de giro da partícula a sexta potência, as partículas de maior tamanho são evidenciadas mesmo se elas estiverem em pequenas quantidades.

Por outro lado, a distribuição em termos de tamanho reforça a participação de partículas de menor tamanho.

As medidas foram realizadas utilizando-se o equipamento Zetasizer ZS fabricado por Malvern Instruments, UK, com detector fixo em um ângulo de 173° e feixe de laser 35 mW, com comprimento de onda de 632.8 nm de um laser de He-Ne, índice de refração 1,3720 e viscosidade 1,22 mPa.s (25°C), e ácido acético puro como solvente.

Foi necessário suspender 3 mg de cada amostra em pó em uma solução sob agitação de 10.000 rpm contendo 40 mL de ácido acético (afim de evitar a formação de precipitados na suspensão de partículas). Posteriormente um ultrassom de ponta, com amplitude de 35% (Cole Parmer Ultrasonic Processor Model CV18, com potência de 500 W), foi utilizado por três ciclos de cinco minutos para favorecer a desaglomeração das partículas, formando uma suspensão homogênea. Uma alíquota desta suspensão foi retirada à meia altura e depositada em uma cubeta apropriada para a análise do tamanho de partículas. Experimento realizado em triplicata. Os gráficos foram confeccionados no Software Origin Pro versão 8.0 DEMO.

III.3.3. DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DRX)

A utilização da difratometria de raios X objetivou fornecer informações sobre a cristalinidade dos materiais: geometria de rede, orientação do cristal, identificação de fases cristalinas, entre outros. Os difratogramas foram obtidos no equipamento Rigaku Ultima+ PCDMAX em modo de varredura contínua, com feixe de radiação CoK α com voltagem de 40 kV e corrente de 40 mA, num intervalo de varredura 1 °/min em 2 θ (10 – 60 °) largura de máscara de exposição de 10 mm.

III.3.4. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (IVTF)

O fornecimento de informações a respeito da estrutura local dos grupos funcionais dos compósitos em suas diferentes composições (Tabela III.1), e de seus precursores, deu-se através da espectroscopia na região do infravermelho. Os espectros de IVTF foram obtidos em equipamento de espectroscopia da IRPrestige-21 Shimadzu com todas as amostras a serem avaliadas compactadas com KBr, formando pastilhas e submetidas à análise na faixa de número de onda compreendido entre 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução espectral de 8 cm^{-1} e acúmulos de 32 espectros por varredura para cada amostra.

III.3.5. TERMOGRAVIMETRIA (TG/DTG)

As medidas de TGs foram executadas em um instrumento de Termogravimetria Universal V4.5A TA Instruments, onde amostras de aproximadamente 10 mg de cada grupo e de seus componentes isolados foram colocadas em um porta amostra de platina aberto e o aparelho foi programado para executar uma curva de aquecimento na faixa de 25 a 800°C, sob taxa de aquecimento constante de 10°C. min^{-1} . As curvas termogravimétricas foram obtidas a partir do primeiro ciclo de aquecimento sob atmosfera dinâmica de argônio (60 mL. min^{-1}). A primeira derivada da curva TG (DTG) foi obtida para melhor visualizar os eventos ocasionados pela perda de massa.

III.3.6. POROSIDADE POR IMERSÃO

A determinação da porosidade média dos compósitos foi avaliada segundo metodologia descrita por SHIMOJO, PEREZ, *et al.* (2012). As amostras dos compósitos foram imersas em nitrogênio líquido [N_2Liq] (White Martins) por 30 segundos e

posteriormente, cortadas em diferentes formas, adaptadas a técnica de caracterização a serem submetidas. Os cortes foram feitos com o auxílio de um bisturi com lâmina de aço carbono número 20.

Para a execução desta análise, foi requerida a determinação da densidade real e teórica de cada amostra calculada através da Equação III.1 e da Equação III.2. A Equação III.3 foi utilizada para calcular a densidade relativa dos arcabouços dos compósitos usando a densidade de cada amostra e a densidade teórica. Assim, a porosidade dos compósitos foi calculada conforme a Equação III.4.

$$\rho_{\text{compósito}} = \frac{\text{massa compósito}}{\text{volume compósito}} \quad (\text{Equação III.1})$$

$$\rho_{\text{teórica}} = x_{\text{HAP}} * \rho_{\text{HAP}} + y_{\text{P}} * \rho_{\text{P}} \quad (\text{Equação III.2})$$

$$\rho_{\text{relativa}} = \frac{\rho_{\text{compósito}}}{\rho_{\text{teórica}}} \quad (\text{Equação III.3})$$

$$\text{porosidade} = 1 - \rho_{\text{relativa}} \quad (\text{Equação III.4})$$

III.3.7. INTUMESCIMENTO

A absorção de fluídos (intumescimento) dos compósitos foi avaliada após a imersão em tampão fosfato pH 7,4 sob temperatura controlada de $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$, utilizando-se de um banho termostatizado Marconi® modelo MA-184. Corpos de volume de 1 cm^3 foram confeccionados e pesados antes e após o intumescimento, sendo avaliadas no tempo de 24 horas. Após o tempo, as amostras foram retiradas do meio e o excesso de líquido foi removido com o auxílio de papel filtro (gramatura 80 g/m^2 , Unifil) e posteriormente pesados.

A quantidade de líquido absorvido pelas amostras foi expressa em porcentagem de ganho de massa após o tempo decorrido, e calculada de acordo com a Equação III.5 abaixo:

$$\% W = \frac{M_i - M_s}{M_s} \times 100 \quad (\text{Equação III.5})$$

onde, %W corresponde ao grau de intumescimento, M_i massa do compósito após à imersão e M_s massa do compósito seco. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

III.3.8. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada com o objetivo de visualizar a superfície do material, parâmetros morfológicos, e quando acoplado ao detector de espalhamento de energia dispersiva (EDS), mostrar a composição elementar.

A preparação das amostras em pó seguiu-se com a suspensão de 2 mg de cada amostra em proporção de solvente (álcool isopropílico, $[C_3H_8O]$, Alphatec): amostra 10:1. Posteriormente um ultrassom de ponta, com amplitude de 35% (Cole Parmer Ultrasonic Processor Model CV18), foi utilizado durante cinco minutos para favorecer a desaglomeração das partículas. Uma lixa d'água 2000 foi utilizada para polir a porta amostra. Um micropipetador comercial (capacidade 1-10 μ L, Kasvi basic) foi utilizado para deposição de uma única gota da solução sobre a porta amostra metálico. Utilizou-se o suporte 2HB com adesão das partículas em substrato de grafite. As imagens foram obtidas em diversos aumentos utilizando-se de uma energia de aceleração de elétrons de 0,5 kV. O material foi submetido à análise de imagem em Microscópio Eletrônico de Varredura (FEG-SEM, JEOL JSM-7500F).

O espalhamento de energia dispersiva foi utilizado com o intuito de revelar a composição elementar. As amostras foram depositadas em substrato metálico, seguindo o procedimento adotado para o preparo das amostras para a análise morfológica, e recoberta com uma película de ouro. Para esta determinação, as imagens foram obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM-6500LV.

O Microscópio Eletrônico FEG-SEM JEOL JSM-7500F foi utilizado para a obtenção de imagens dos compósitos, em diversos aumentos utilizando-se de uma energia de aceleração de elétrons de 0,5 a 2 kV. O compósito foi seccionado em dimensões apropriadas para encaixe no suporte para a microscopia e aderido a este com o auxílio de fitas de carbono.

Os arcabouços dos diferentes compósitos foram analisadas quanto a porosidade utilizando-se do Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM-6500LV, sob uma energia de aceleração de elétrons de 10 kV e em diversos aumentos.

Todas as imagens foram adquiridas no Centro Multiusuário em Nanotecnologia da UFS (CMNano).

III.3.9. ESPALHAMENTO DE RAIOS X A BAIXOS ÂNGULOS (SAXS)

Os compósitos foram analisados usando feixe monocromático na linha de SAXS1 do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (Proposta SAXS1 – 17113), com comprimento de onda de 1,55 Å e distância detector-amostra de 982 nm. A intensidade de espalhamento $I(q)$ foi expressa em unidade arbitrárias, e o espalhamento das amostras foi obtido descontando-se o espalhamento do vazio ou do solvente usado na suspensão da amostra, quando necessário. Foram observados os compósitos em todos seus estágios do processo de secagem: a amostra congelada, durante a liofilização e o arcabouço seco. As curvas foram confeccionadas usando o software OringinPro 8.0 DEMO.

Para avaliar a estruturação dos arcabouços durante o processo de liofilização através do SAXS, medidas *in situ* foram realizadas acoplando-se um criostato de circuito fechado de He (Liq), mantendo a temperatura de aproximadamente -15°C; e o controle da pressão negativa com o auxílio de uma bomba de vácuo.

III.3.10. TOMOGRAFIA DE RAIOS X UTILIZANDO FONTES DE RADIAÇÃO SINCROTRON (TCRS)

Os compósitos secos foram analisados usando feixe branco e monocromático na linha de IMX do LNLS (Proposta IMX-17079). As imagens de alta resolução foram capturadas usando tanto a tomografia como o contraste de fases, faixa de 0-180° em steps de 0,18°, resultando em 1000 imagens. As imagens foram reconstruídas utilizando-se um software desenvolvido pelo pesquisador Dr. Eduardo Miqueles Xavier do grupo de pesquisa da linha IMX do LNLS, e foram geradas utilizando-se o software de imagens o Avizo 8.0.

III.3.11. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (CITOTOXICIDADE)

O efeito citotóxico dos compósitos GI, GIII e GV em macrófagos foi estudado utilizando o método (3- (4,5- dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT) de acordo com MOSMANN (1983). Utilizou-se uma linhagem de macrófagos murinos (J774A.1) cultivada em meio RPMI-1640 suplementado [10% de SBF (soro fetal de bovino), 100 mM de L-glutamina e 40 µg/mL de gentamicina] em estufa de CO₂ a 5% (37°C). As células foram distribuídas em uma placa de 96 poços (1,5 x 10⁵ células/poço) e após 16 horas de incubação, as células aderentes foram tratadas com os compósitos em concentrações entre 10 e 100 µg/mL em meio de cultura RPMI suplementado. 3 horas após o tratamento, o meio foi substituído com meio RPMI fresco contendo 5 mg/mL de MTT. Após 4 horas de incubação adicional a 37°C, o sobrenadante foi descarregado e solução de dimetilsulfóxido, [C₂H₆OS], (Synth®) (150 µL/poço) foi adicionada a cada placa de cultura para solubilização dos cristais de formazan formados. Após 15 min de incubação à temperatura ambiente, a absorbância do produto solubilizado MTT foi medida espectrofotometricamente a 540 nm. Quatro cavidades individuais foram ensaiadas por tratamento, e a atividade de redução de MTT foi determinada como

porcentagem das células de controle ($[\text{absorbância de células tratadas} / \text{absorbância de células não tratadas}] \times 100$) (ARAUJO, SANTOS, *et al.*, 2014). Os ensaios foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Alagoas sob supervisão do professor Dr. Emiliano Barreto.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES

IV.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA, QUÍMICA, MORFOLÓGICA E ESTRUTURAL

IV.1.1. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE DESACETILAÇÃO DA QUITOSANA

As curvas apresentadas na Figura IV.1 são típicas de uma titulação ácida – base condutimétrica, a qual tem como princípio a determinação da condutividade do meio expressa em função do volume do titulante. Inicialmente, ocorre a neutralização do ácido clorídrico pela adição de hidróxido de sódio (titulante), de forma que os íons H^+ provenientes do ácido clorídrico presentes na solução são substituídos pelos íons Na^+ , resultando na redução brusca da condutividade do meio. Após a neutralização do ácido forte (v_1), a adição de hidróxido de sódio promove a desprotonação dos grupos amino da quitosana, promovendo ligeiro aumento da condutividade do meio. Concluída a neutralização dos grupos $-NH^{3+}$ presentes (v_2), a adição de excesso de base resulta no aumento de concentração de íons hidroxila na solução e na elevação da condutividade (BEIL, SCHAMBERGER, *et al.*, 2012). Dessa forma, o grau médio de desacetilação da quitosana pode ser determinado pela fórmula:

$$\%NH_2 = \frac{161 \cdot [base] \cdot (v_2 - v_1)}{M} \times 100 \quad (\text{Equação IV.1})$$

o qual, v_1 e v_2 correspondem aos volumes de base usados na neutralização do excesso de ácido e para a neutralização da amostra de quitosana protonada, respectivamente; $[base]$ é a concentração da base usada e M é a massa em mg de quitosana.

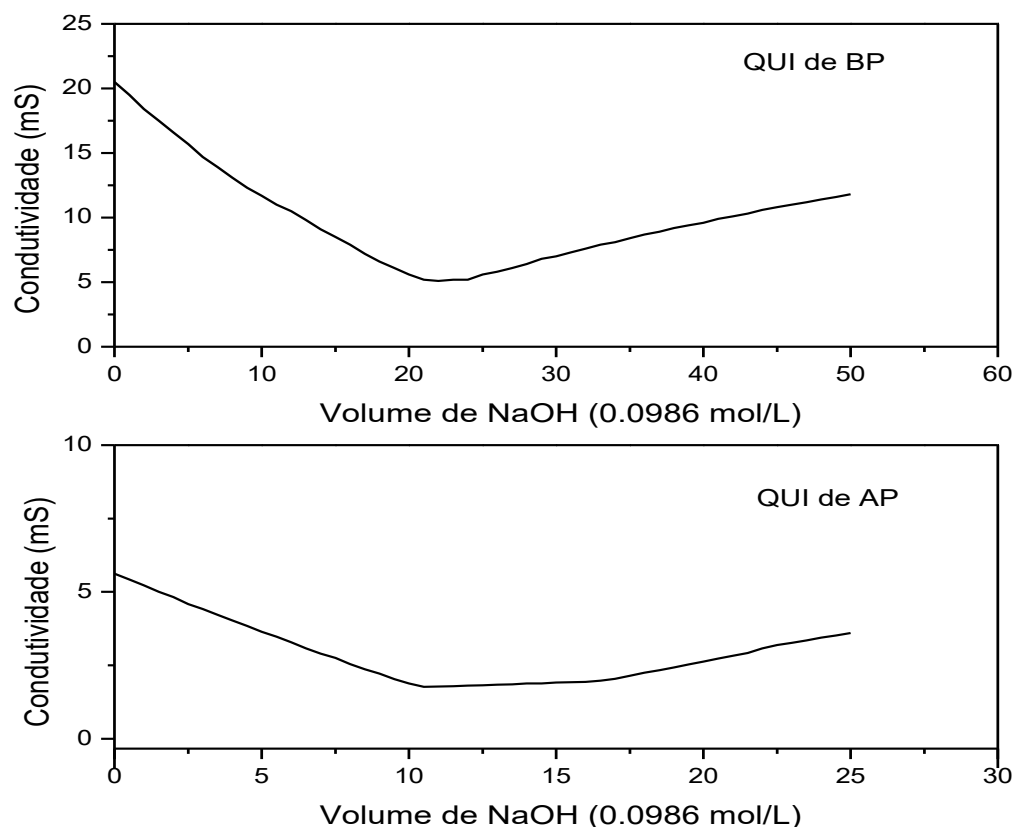


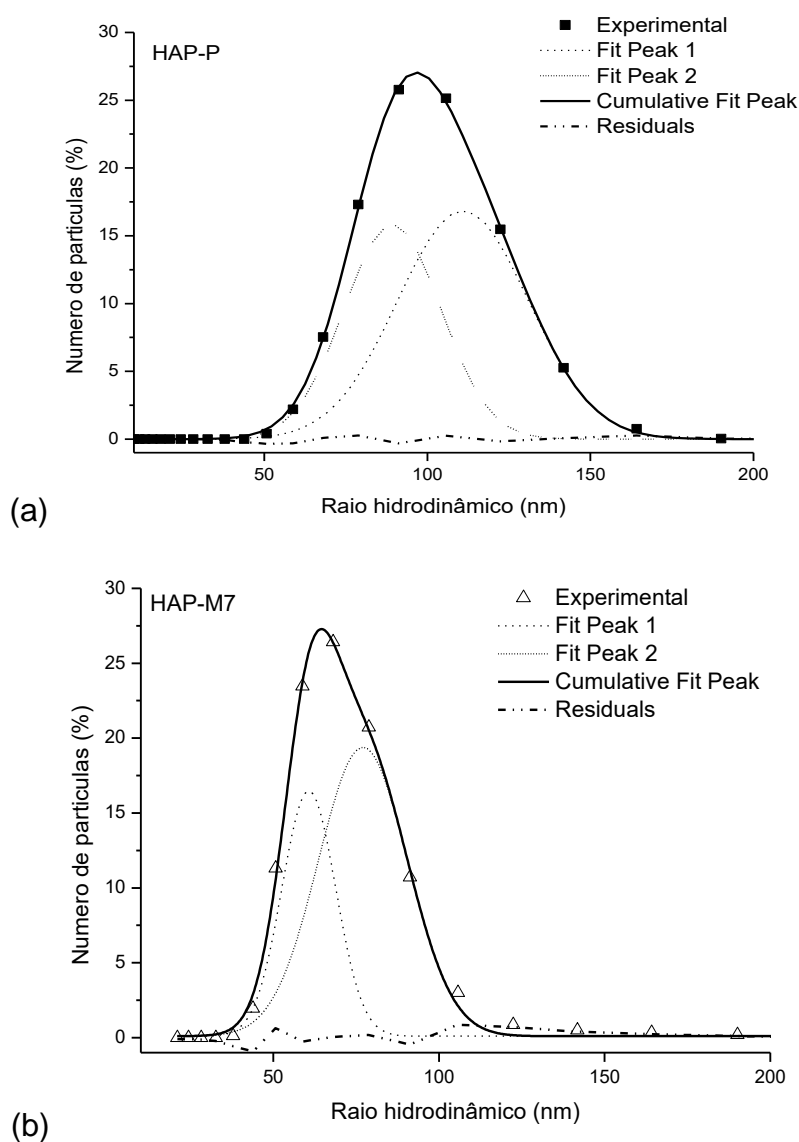
Figura IV.1. Curva de titulação condutimétrica característica de uma amostra de QAP e de QBP.

Observa-se, portanto, que o GD para as quitosanas avaliadas foram de 63,49 e 95,25% para a de BP e AP, respectivamente. Comercialmente, as quitosanas podem apresentar um GD entre 60 e 100% (THEIN-HAN, MISRA, 2009; PIGHINELLI, KUCHARSKA, 2013), demonstrando conformidade das quitosanas deste estudo com os padrões de mercado.

Estando ciente que estas diferenças no GD, as quitosanas apresentarão diferentes propriedades físico-químicas que poderão, ou não, contribuir na formação do compósito. Sendo assim, a viabilidade de estudo de quitosanas de GD diferentes em compósitos torna-se essencial ao desenvolvimento de novos biomateriais sem distinção de características.

IV.1.2. ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ (EDL)

As Figuras IV.2 e IV.3, apresentadas abaixo, referem-se aos dados de distribuição de tamanhos das diferentes amostras de HAP (HAP-P, HAP-M7 e HAP-M15) através do espalhamento dinâmico de luz (EDL). É possível observar que a distribuição ocorreu em intervalos de tamanhos próximos, com predominância de partículas entre 50-250 nm.



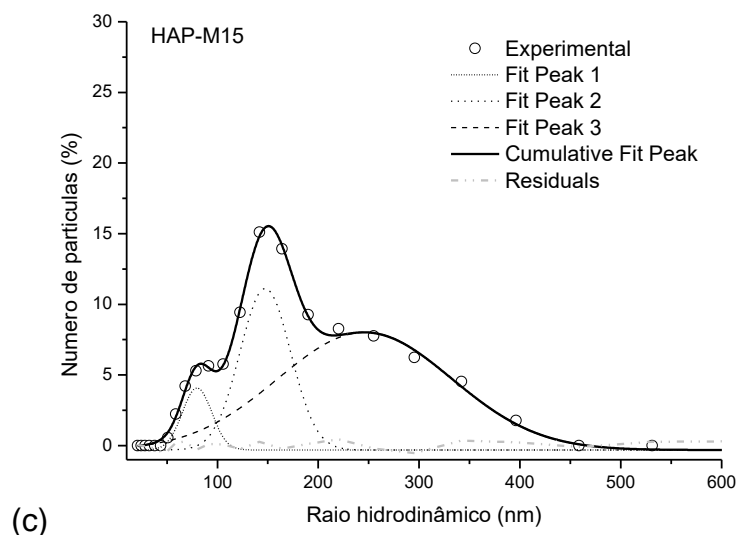


Figura IV.2. Histograma de distribuição do número de partículas (%) em função do tamanho: (a) HAP-P, (b) HAP-M7 e (c) HAP-M15.

Através da curva experimental para a amostra HAP-P é possível notar um perfil único de distribuição com tamanhos de partículas centrados em 96 nm. Comparando os resultados da distribuição para a HAP-P e para a HAP-M7, observa-se uma redução no tamanho de partículas quando a estas formam adicionados 7% de AE, chegando a 68 nm. Tal fato pode estar associado a dissociação de pequenos aglomerados de partículas na HAP-P (tamanho próximo ao 100 nm), e recobrimento destas com o AE, já que este é inserido as partículas formadas.

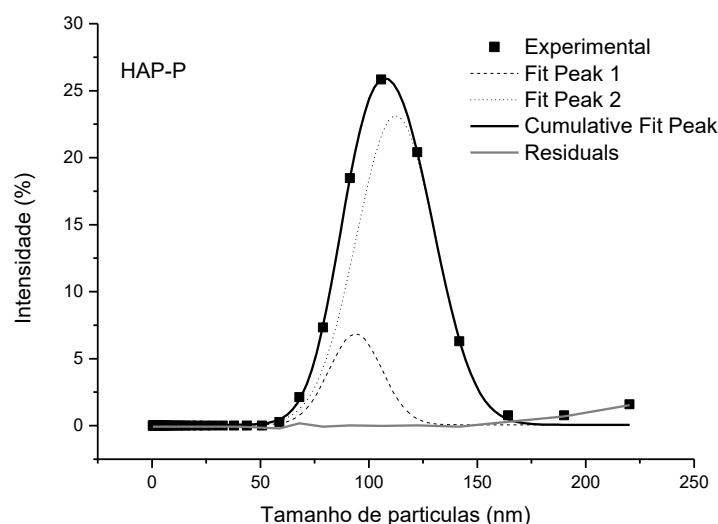
A modificação de superfície ocorre, provavelmente, através da formação de ligações químicas, como as de hidrogênio, entre os principais grupos funcionais de superfície de ambos (BARABÁS, CZIKÓ, *et al.*, 2013). Apesar de ser formada apenas por 18 carbonos (HOTZA, 1997), a cadeia de hidrocarbonetos do AE forma uma barreira mecânica na superfície da HAP, impedindo que estas aglomerem-se.

Por outro lado, a HAP-M15 revelou uma curva larga, composta por sobreposições de três picos de 79, 147 e 248 nm de tamanho médio. Isto sugere que a

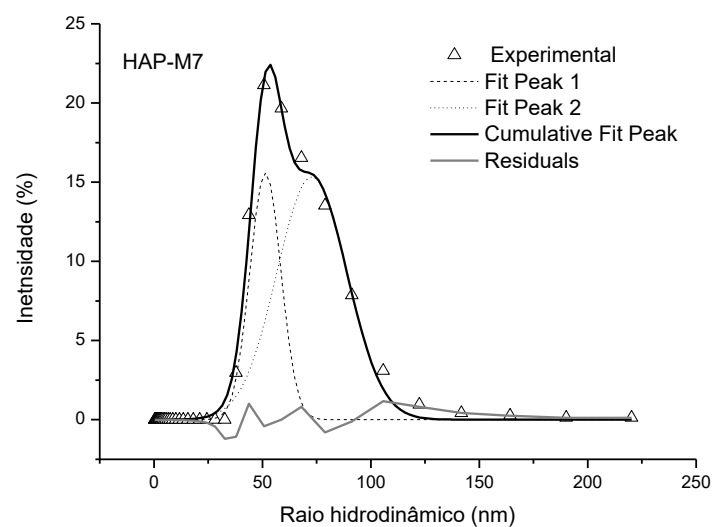
modificação da superfície das partículas interferiu significativamente no tamanho delas, e que a inserção do AE é influenciada pelo o aumento da quantidade do lipídeo.

A permanência da primeira população em 79 nm, reforça a ideia que ocorre de fato o recobrimento das partículas e formação de barreiras que limitam o seu crescimento. Entretanto, a presença dos demais grupos de tamanhos sugere que este não é apenas o único mecanismo de estabilização e recobrimento superficial das partículas de HAP. Provavelmente, um excesso de AE forma múltiplas camadas ao redor da HAp, aumentando consigo o tamanho. Ou, simplesmente, o excesso de AE adicionado forma pequenos aglomerados.

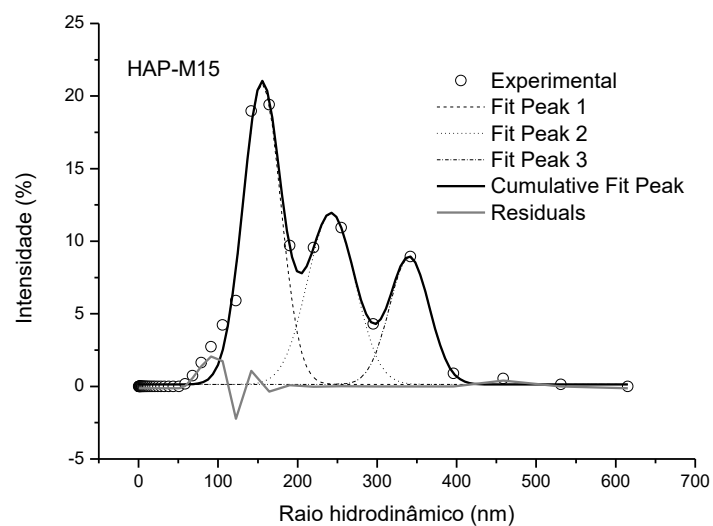
Partículas grandes tem a capacidade de espalhar mais a luz incidente do que as pequenas, mesmo presente em pequenas quantidades. A representação por intensidade auxilia na detecção de populações de tamanhos distintos, que sob outras condições (gráfico de número, por exemplo), não são facilmente visualizadas. Na Figura IV.3 é possível visualizar que para uma mesma amostra de HAP-P até cinco populações de tamanhos, sendo a mais significativa a com pico máximo em 104 nm. Para a HAP-M15, é observada a presença de três picos de intensidade relativa alta na mesma faixa de tamanho observado no gráfico de números. A comparação entre estas amostras confirma o crescimento da HAP associado a adição do AE.



(a)



(b)



(c)

Figura IV.3. Histograma de distribuição de tamanho de partícula em função da intensidade de espalhamento (%): (a) HAP-P, (b) HAP-M7 e (c) HAP-M15.

Ao implantar moléculas de AE na superfície da HAP, é esperado um aumento no seu volume decorrente da inserção de cadeias de hidrocarbonetos, característica do AE, o que foi observado apenas para a amostra de maior concentração (HAP-M15). Alguns materiais são ótimos estabilizantes de superfície, tais como substância com longas cadeias, elas recobrem a partícula e ‘impedem’ seu crescimento. Este efeito está

associado a estabilização estérica ou eletrostática. Segundo BARABÁS, CZIKÓ, *et al.* (2013), os grupos hidroxilas da HAP localizados na superfície da partícula podem formar ligações de hidrogênio com outras substâncias, tais como polímeros (relatado em seu trabalho), prevenindo a sua aglomeração, através de uma estabilização estérica.

A estabilização estérica dependerá das propriedades de superfície da partícula, do agente modificador de superfície e da camada formada após sua inclusão. Geralmente, ela está associada a adsorção de longas cadeias à superfície da partícula. O AE, apesar de ser formada por uma cadeia de apenas 18 carbonos, pode estabilizar suspensões de partículas também por adsorção, porém seu mecanismo ocorre por uma estabilização semi-estérica (HOTZA, 1997).

O AE interage com a superfície da HAP através de ligações de hidrogênio entre a porção polar do lipídeo e os grupos hidroxilas de superfície (Figura IV.4). As cadeias de hidrocarboneto servem de barreira mecânica, impedindo a aproximação das partículas, e conseqüentemente, freando seu crescimento ou aglomeração.

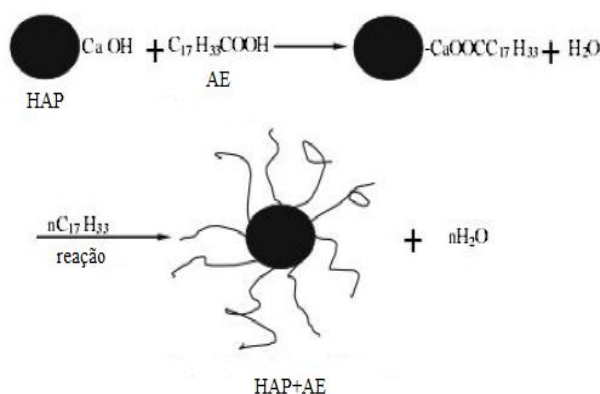


Figura IV.4. Equação global de esterificação da HAP com o AE. (Fonte: Adaptado de LI, WENG, 2008)

Contudo, esta afirmativa não segue para a HAP-M15, pois o aumento da concentração do AE não levou somente a um aumento no tamanho da partícula. Possivelmente, a quantidade de AE utilizada foi maior do que o necessário ao

recobrimento da partícula, formando aglomerados de AE que contribuíram para este resultado.

LI, WENG (2008) observaram em estudo semelhante, no qual foi avaliado a influência da concentração do AE no grau de interação com a superfície da HAP, um ligeiro aumento na distribuição de tamanhos após a funcionalização da superfície.

IV.1.3. DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DRX)

A difratometria de raios X foi uma importante técnica que permitiu analisar as fases cristalinas, identifica-las e avaliar a influência da composição na relação estrutural do material produzido. A ficha ICSD 151414, correspondente ao padrão cristalográfico da hidroxiapatita, foi utilizada para efeitos de comparação e confirmação da presença desta nos compósitos (ANDRADE, DA SILVA, 2004), e está representada na parte inferior da Figura IV.5. As Figuras IV.5, IV.6 e IV.7 exibem o difratograma das amostras estudadas.

A Figura IV.5 mostra que há formação da HAP hexagonal através da presença dos picos de alta intensidade (relação sinal ruído) entre 29 e 37°, correspondentes aos planos cristalinos (002), (211), (112) e (300) para hidroxiapatitas (KALITA, VERMA, 2010; HE, CHANG, *et al.*, 2012; KUMAR, GIRIJA, *et al.*, 2010). A amostra de HAP-P apresentou-se como fase única, já que nenhuma fase adicional foi encontrada em seu difratograma. Há predominância de picos alargados de baixa intensidade, provavelmente relacionados ao tamanho manométrico dos cristais de apatita.

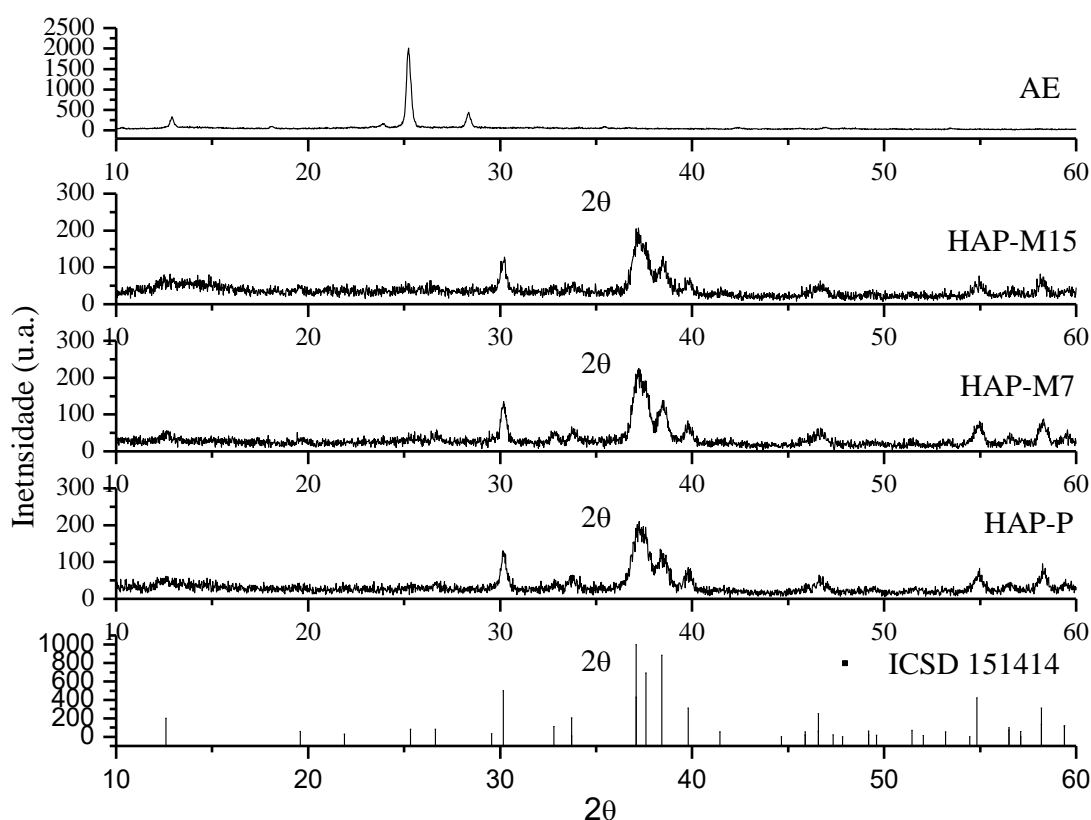


Figura IV.5. Difratoograma de raios X das hidroxiapatitas, do AE e do padrão.

A modificação da superfície da HAP com o AE não alterou a característica estrutural desta, sendo observados apenas a redução da intensidade dos principais picos de difração da HAP ocasionados pelo AE. ZHANG, LI, *et al.* (2012), utilizaram a difratometria de raios X para verificar a influência do AE no recobrimento de partículas de apatita para adesão ao titânio. Eles observaram que o perfil de difração se assemelhava, indicando que o processo de recobrimento não altera a cristalinidade da amostra. Contudo, LI, WENG (2008) e NUNES, VALERIO, *et al.* (2011), em trabalhos semelhantes de funcionalização e recobrimento com AE, observaram pequenas alterações do perfil cristalográfico da HAP ocasionados pelo AE. Estes, porém, podem estar relacionados ao processo de recristalização do AE nos diferentes solventes utilizados nestes trabalhos, assumindo um perfil diferente da amostra isolada. Isto é

característica de materiais polimorfos, os quais recristalizam sob diferentes formas após solubilização em diferentes solventes.

As Figuras IV.6 e IV.7 apresentam os difratogramas de raios X dos polímeros (QAP, QBP e HEC), e seus respectivos compósitos. Materiais poliméricos possuem um nível de organização estrutural irregular o que caracteriza, em sua maioria, em amorficidade e/ou semi-cristalinidade. As quitosanas (QAP e QBP) e o HEC apresentaram duas linhas de difração alargadas: uma de pequena intensidade (16° para QAP; $13,6^\circ$ para QBP; $13,8^\circ$ para HEC) e outra de maior intensidade ($20,2^\circ$ para QAP; $23,6^\circ$ para QBP; $23,6^\circ$ para HEC), característicos da estrutura contendo ligações N-glucosaminas presentes em estruturas poliméricas derivadas da celulose (PETER, BINULAL, *et al.*, 2010; HE, CHANG, *et al.*, 2012; AZEVEDO, SIZILIO, *et al.*, 2011). A presença de ambos os picos em 2θ para a quitosana está interligada à associação dos planos (001) e (100) (LIU, CHEN, *et al.*, 2014; SAMANTA, RAY, 2014). A HEC apresentou ainda dois outros picos em 37° e $53,5^\circ$ em 2θ (KALYANI, SMITHA, *et al.*, 2006).

O difratograma de raios X para os compósitos (Figuras IV.6 e IV.7) se assemelharam aos da HAP com e sem modificação, para seus respectivos grupos. A presença do polímero não ocasionou nenhuma alteração significativa no difratograma, já que estes são predominantemente amorfos. Confrontados com o padrão da HAP (Ficha ICSD 151414), os compósitos exibiram picos situados na mesma região, confirmando a presença desta biocerâmica.

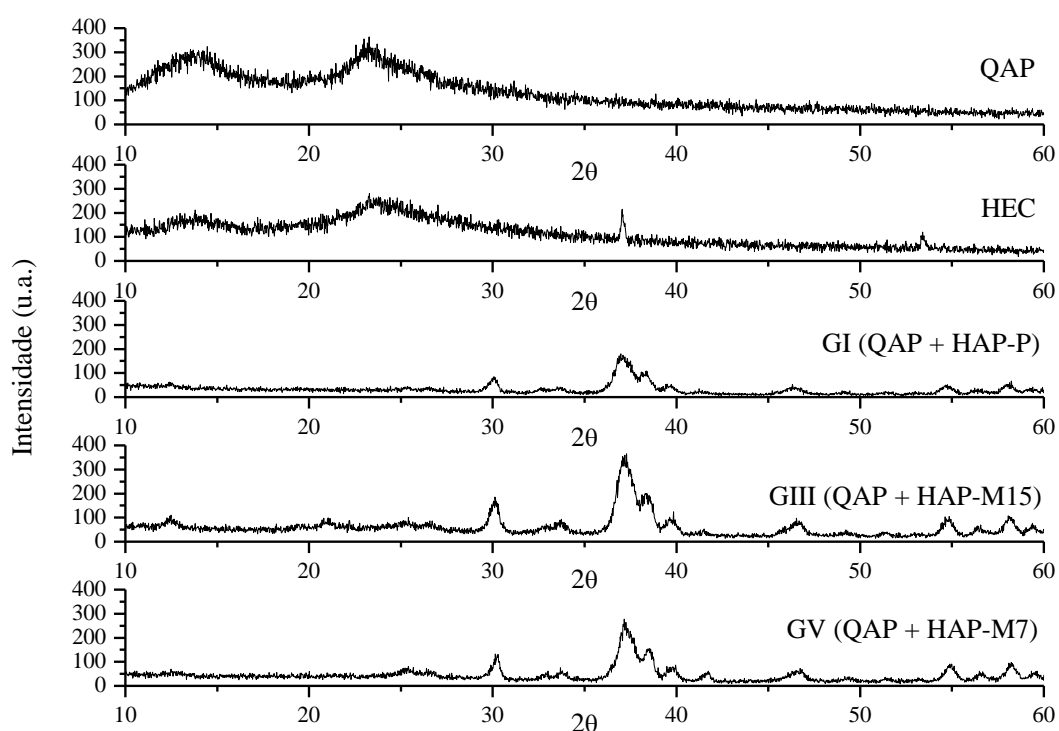


Figura IV.6. Difratograma de raios X dos compósitos de QAP e do padrão cristalográfico da HAP.

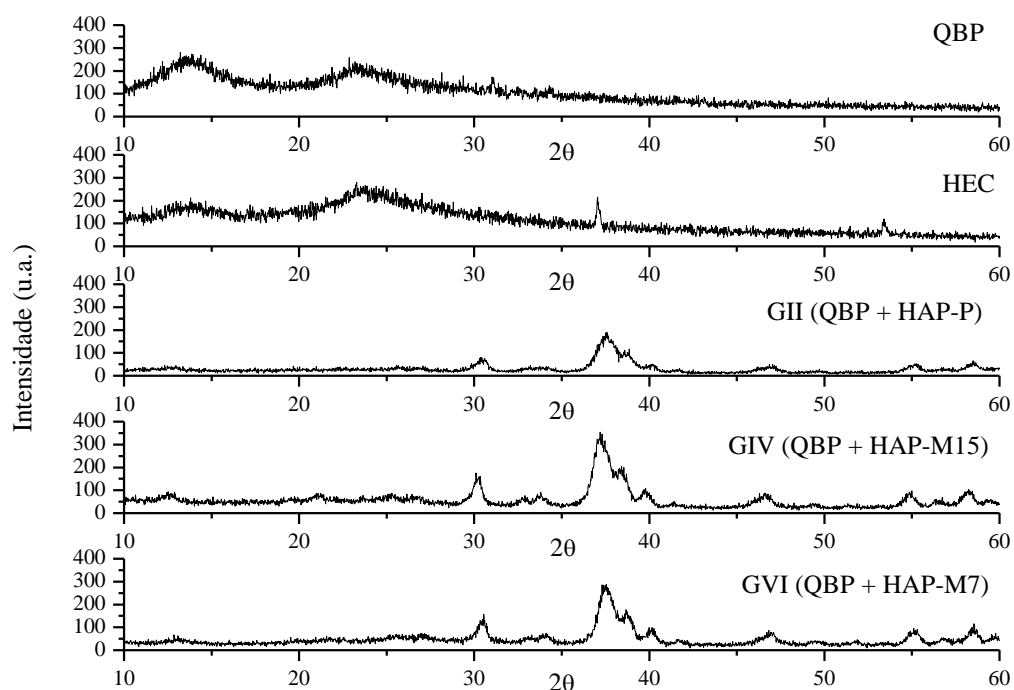


Figura IV.7. Difratograma de raios X dos compósitos de QBP e do padrão cristalográfico da HAP.

A alteração da composição dos compósitos e a alta fração de inorgânicos nas amostras contribuíram para as diferenças no grau de cristalinidade destes, observando-se o aumento da intensidade relativa após a inserção do AE na HAP e do aumento de sua concentração. Os grupos I e II, formados por HAP-P, apresentaram menor intensidade de picos quando comparados aos grupos V e VI, por exemplo, os quais continham HAP-M7 (7% de AE).

IV.1.4. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (IVTF)

Os espectros na região do infravermelho para a HAP-P, HAP-M7, HAP-M15 e AE estão representadas na Figura IV.8. A identificação e atribuição dos grupos funcionais, essencialmente hidroxilas, fosfatos e metilas/metilenos, foram determinantes na caracterização e comprovação da reação de modificação de superfície. Nota-se a presença de picos associados a vibrações de íons fosfatos em 1090, 1036, 962, 602, 566 e 472 cm^{-1} . Picos localizados em 1090, 962 e 566 cm^{-1} atribuem-se ao estiramento dos fosfatos (PO). Vibrações deformacionais dos fosfatos (P-O, P=O e O-P-O) são apresentadas com um pico intenso em 1036 cm^{-1} , um fraco em 602 cm^{-1} e outro em 472 cm^{-1} . Observa-se também o surgimento de picos correspondentes ao estiramento de hidroxilas: em 3570 e 630 cm^{-1} , relacionado ao OH- de constituição do material; e em 3456 e 1638 cm^{-1} , à água adsorvida (CAI, TONG, *et al.*, 2009; XIANMIAO, YUBAO, *et al.*, 2009; BARABÁS, CZIKÓ, *et al.*, 2013). A presença de grupos carbonatados (CO_3^{2-}) é comumente encontrada em apatitas sintéticas e em ossos naturais (TAI, FU, *et al.*, 2012). O surgimento de grupos carbonatados na HAP é bastante característico do método de precipitação por via úmida e possui uma relação estreita com a solubilidade desta, sendo que a existência destes grupos leva a uma maior solubilidade do material (PALUSZKIEWICZ, BLAZEWICZ, *et al.*, 2008; LIMA, 2010).

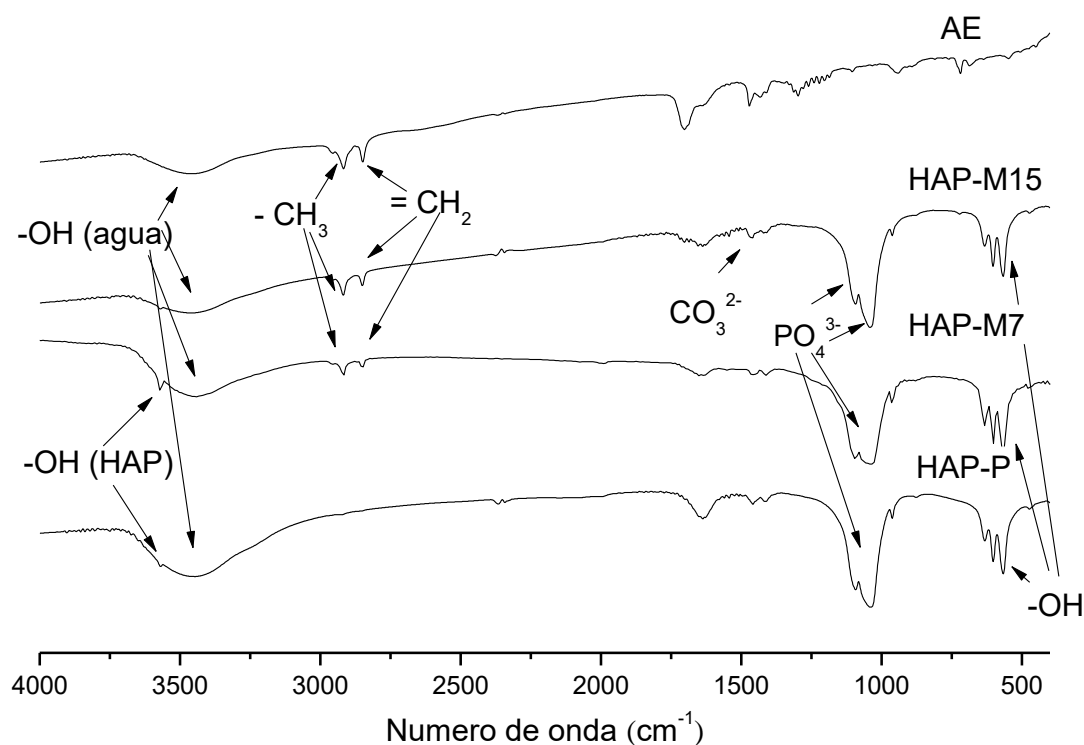


Figura IV.8. Espectros de absorção na região do infravermelho para as hidroxiapatita (HAP-P, HAP-M7 e HAP-M15) e AE.

No espectro do AE, são observados picos em: 721 cm^{-1} , referente a deformação de alcenos dissustituídos e picos em 2917 , 2859 e 1470 cm^{-1} , associado ao estiramento de grupos metil e metilenos. Observa-se também um pico em 1707 cm^{-1} correspondente ao grupo carboxílico. Uma banda em 3464 cm^{-1} referente a hidroxilas oriundas de água adsorvidas é visualizada, provavelmente fixadas após a compactação das pastilhas de KBr. Uma banda em 1414 cm^{-1} de pequena intensidade é atribuída a íons carbonáceos.

A funcionalização da superfície da HAP pela inserção do AE é verificada através de uma análise minuciosa entre os espectros (Figura IV.8). Pequenos deslocamentos em alguns picos e bandas características da HAP forma observados e estão descritos na Tabela IV.1. Podem ser encontrados ainda picos adicionais, não visualizados no espectro da HAP pura, caracterizando a modificação da superfície. A banda em 1546

cm^{-1} é devido à vibração de grupos COO^-Ca^+ originada na reação e esterificação entre íons Ca^{2+} e COOH da HAP e AE, respectivamente (LI, WENG, 2008).

Outra característica que permite sugerir que a funcionalização foi efetiva está na presença de grupos metil e metileno do AE na região compreendida entre 2920-2840 cm^{-1} , ausente no espectro da HAP pura. A funcionalização das partículas de HAP indica uma melhor afinidade entre estes nanocristais e suspensões orgânicas (LIMA, 2010). A discriminação dos grupos principais analisados encontra-se na Tabela IV.1 abaixo.

Tabela IV.1. Comprimentos de onda característicos da HAP-P, HAP-M7, HAP-M15 e do AE.

GRUPOS CARACTERÍSTICOS	HAP-P (cm^{-1})	HAP-M7 (cm^{-1})	HAP-M15 (cm^{-1})	AE (cm^{-1})
-OH (constituição)	3570	3572	3572	-
-OH (água adsorvida)	630 3456 1638	632 3412 1618	632 3442 1638	3464
- PO_4^{3-}	1090 1036 962 602 566	1093 1033 962 603 567	1096 1034 962 604 566	-
CO_3^{2-}	1458 1404	-	1414	1414
O-P-O	472	-	472	-
R-C=C-R	-	-	722	721
CH_3 - e CH_2 -	-	2918 2956 2848	2918 2859 1464	2917 2859 1470
-COOH	-	-	1704	1707
- COO^-Ca^+	-	1556	1546	-

A análise dos espectros IVTF dos polímeros presentes na Figura IV.9, revelou características importantes a respeito de suas estruturas. As quitosanas apresentaram uma intensa banda em 3450 cm^{-1} relacionada a estiramento vibracional de hidroxilas e aminas primarias; uma banda de deformação axial C=O em 1640 cm^{-1} , correspondente à amida I ou moléculas de H_2O ; um pico de deformação angular simétrica de CH_3 em 1380 cm^{-1} ; bandas de estiramento assimétrico de C-O-C em 1156 cm^{-1} e vibrações de estiramento de C-O em 1072 e 1024 cm^{-1} (HE, CHANG, *et al.*, 2012; KUMAR, GIRIJA,

et al., 2010; SARAVANAN, NETHALA, *et al.*, 2011; SAMANTA, RAY, 2014; ARCHANA, SINGH, *et al.*, 2013; CZUBENKO, PIEROÓG, *et al.*, 2013). A presença de grupos amida I nos espectros da quitosana está associada a N-acetilação parcial da quitina, precursor deste polímero, correlacionando-se ao seu grau de desacetilação. Quanto mais intensa for esta banda, maior o número de grupos amidas I na estrutura e, assim, menor o grau de desacetilação (PETER, BINULAL, *et al.*, 2011; BEIL, SCHAMBERGER, *et al.*, 2012). Entretanto, não foram observadas diferenças nas intensidades das bandas de deformação axial das amidas I, em 1640 cm^{-1} , para ambas as amostras. Por tratar-se de uma análise qualitativa, esta diferença não pode ser observada; sendo necessária análise quantitativa (titulação condutimétrica) para inferir tais resultados.

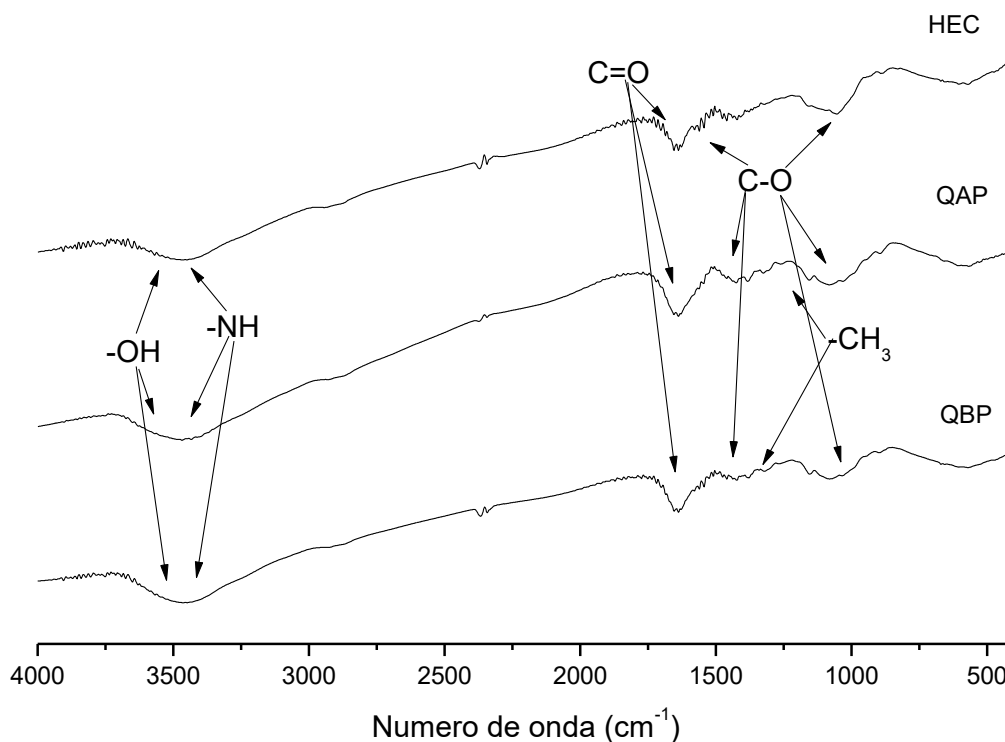


Figura IV.9. Espectros de absorção na região do infravermelho para QAP, QBP e HEC.

O espectro da HEC (Figura IV.9) apresentou uma banda intensa em 3468 cm^{-1} referente a grupos hidroxilas de sua estrutura, picos de baixa intensidade em 1640 cm^{-1} correspondentes a deformação axial de C=O ou moléculas de H_2O , e estiramento de C-O em 1048 cm^{-1} (KALYANI, SMITHA, *et al.*, 2006; HE, CHANG, *et al.*, 2012).

A partir da análise dos espectros no infravermelho dos compósitos (Figuras IV.10 IV.11), observa-se que a interação dos grupos funcionais dos constituintes isolados resultou em suas formações. Todos os espectros apresentaram-se semelhantes, com apenas pequenos deslocamentos na posição de seus principais picos.

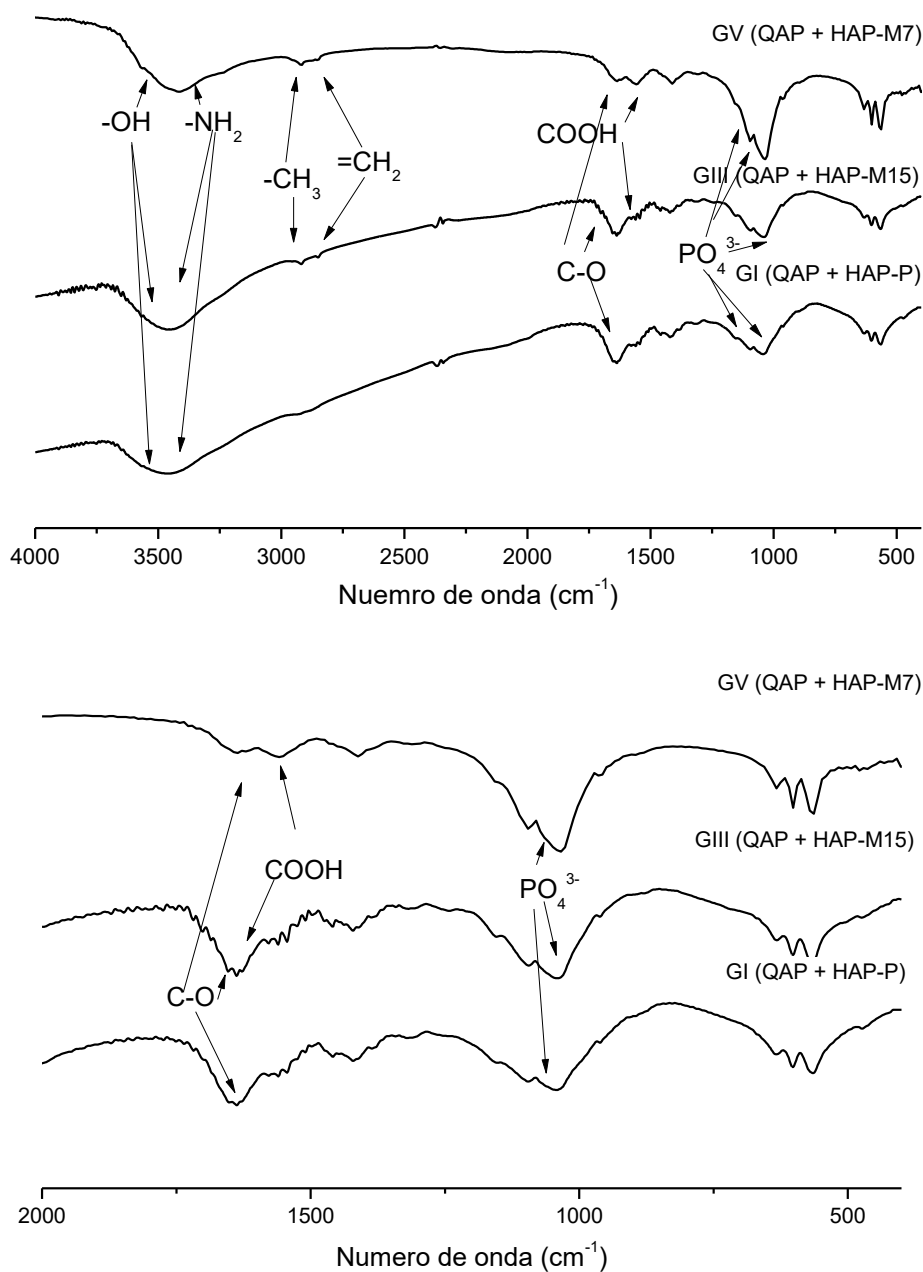


Figura IV.10. (a) Espectros de absorção no infravermelho dos compósitos GI, GIII e GV, constituídas de QAP, HEC e hidroxiapatita com e sem modificação de superfície; (b) Espectros ampliados na região entre 2000 a 400 cm^{-1} .

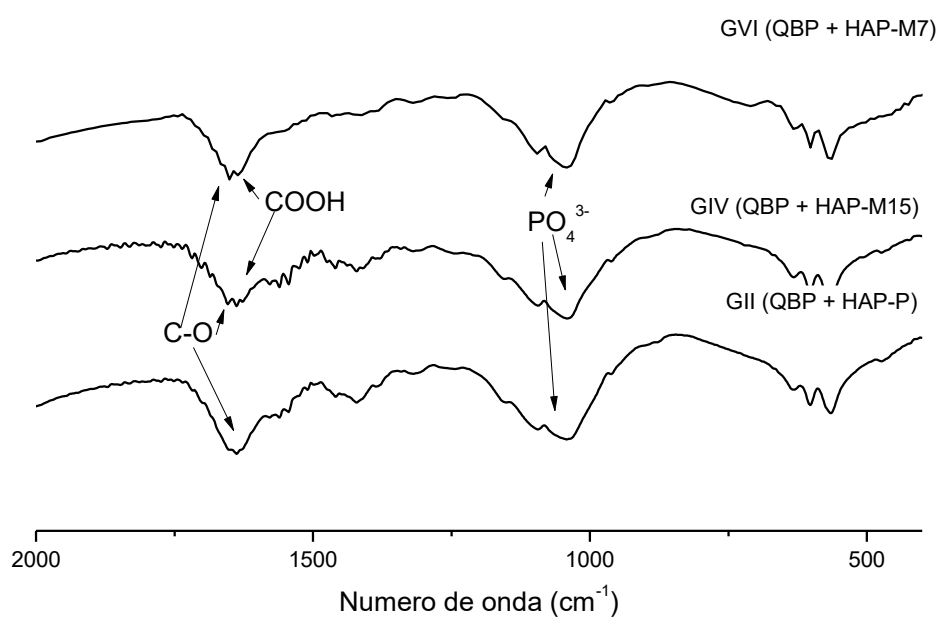
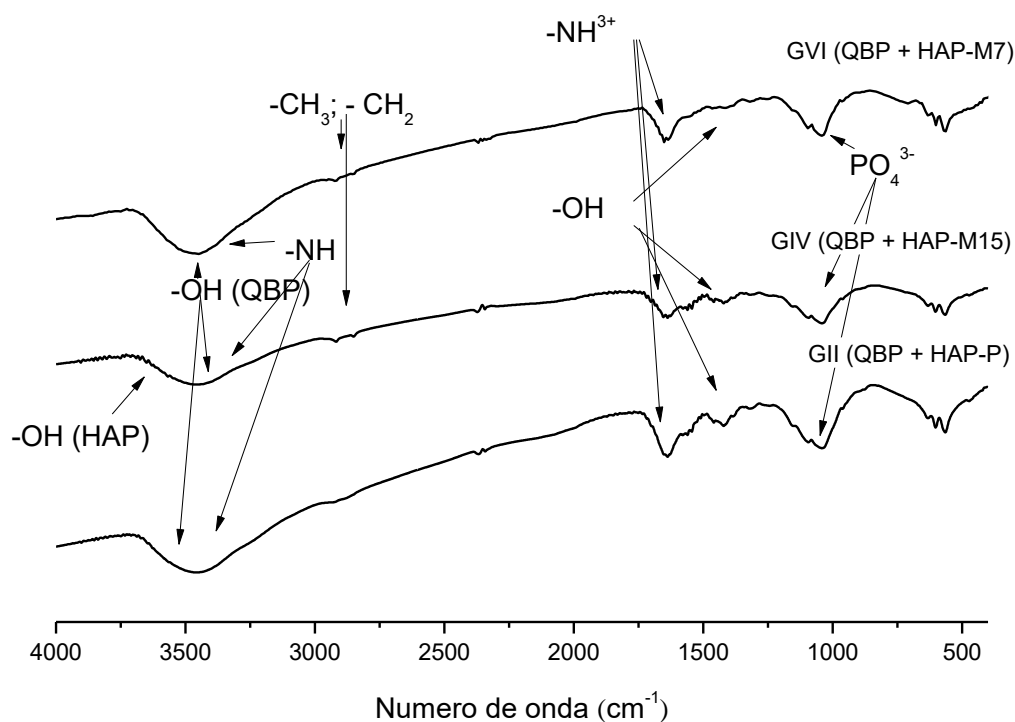


Figura IV.11. (a) Espectros de absorção no infravermelho dos compósitos GII, GIV e GVI, constituídas de QBP, HEC e hidroxiapatita com e sem modificação de superfície; (b) Espectros ampliados na região entre 2000 a 400 cm^{-1} .

Observou-se um alargamento da banda situada em 1098 e 1040 cm^{-1} , corresponde à interação entre o polímero e os íons fosfatos da HAP. Os picos em torno de 1600 cm^{-1} correspondem a $-\text{NH}_2$ da quitosana e $-\text{OH}$ adsorvidas. Uma banda larga entre 3500-3300 cm^{-1} corresponde às hidroxilas e aminas da quitosana. As vibrações em 564, 602 e 1044 cm^{-1} correspondem a íons fosfatos. O estiramento de grupos hidroxilas presentes nas HAP's situada em 3570 cm^{-1} desapareceram após a formação do compósito, levando a sugerir que estes podem estar sobrepostos aos grupos $-\text{NH}_2$ e $-\text{OH}$ dos polímeros (devido a sua abundância), bem como ser um dos pontos de interação. Segundo XIANMIAO, YUBAO, *et al.* (2009), o desaparecimento do pico correspondente aos íons hidroxilas da hidroxiapatita provavelmente está relacionado a interação entre este e os grupos hidroxilas e aminas da quitosana, formando pontes de hidrogênio, os quais absorvem na faixa de comprimento de onda situado entre 3500-3300 cm^{-1} .

O tipo de quitosana utilizada na confecção dos compósitos não interferiu no perfil dos espectros. Entretanto, foram observados picos adicionais, referentes à HAP-M nos grupos os quais continham o AE. A HAP funcionalizada com AE apresenta pequenos picos na região compreendida entre 2920-2840 cm^{-1} , referente à presença de grupos metil e metileno, como relatado anteriormente. Ela foi utilizada com o intuito de melhorar a afinidade entre os nanocristais de hidroxiapatita e o material orgânico.

A redução da intensidade do pico em 1546 cm^{-1} e deslocamento para valores menores (próximo a 1524 cm^{-1} , e variável para cada composição) indicam a existência de uma provável interação entre o PO_4^{3-} e o NH_3^+ da HAP e quitosana, respectivamente. Do ponto de vista químico, as partículas de hidroxiapatita ancoram sob a superfície do arcabouço polimérico QS + HEC através de ligações iônicas proporcionados por grupos carregados negativamente (C-O- e -O-H) da quitosana ou dos grupos aminos. BABAEI, JAHANSHAHI, *et al.* (2013) estudaram a produção de compósitos através da síntese *in situ* da hidroxiapatita em uma dispersão polimérica, e sugeriram que estes grupos funcionais seriam os responsáveis pela formação de camadas alternadas de conteúdo

orgânico e inorgânico ao longo da estrutura do compósito. Os íons cálcio eram atraídos por carbonilas e aminas do polímero; por sua vez, os íons cálcio atraíam os íons fosfatos da suspensão, formando cristais de hidroxiapatita; estes fosfatos atraíam os grupos químicos carregados do gel polimérico, e as camadas eram formadas pela alternância de polímero e inorgânico. No trabalho destes autores, a hidroxiapatita foi formada pela introdução de seus precursores à dispersão polimérica e pelo ancoramento de seus íons, após suspensão, ao polímero. Esta proposição também foi indicada por TANASE, POPA, *et al.* (2011) ao trabalhar com a confecção de arcabouços pela precipitação de fosfato de cálcio pela adição de cloreto de cálcio e fosfato de sódio ao polímero.

A formação do compósito foi sugerida também pela visualização de um alargamento da banda situada em 1098 e 1040 cm^{-1} (interação entre o polímero e os íons fosfatos da HAP); desaparecimento do pico em 3570 cm^{-1} (de hidroxilas da HAP), com base no exposto por XIANMIAO, YUBAO, *et al.* (2009). Estes autores declararam que o desaparecimento do pico correspondente aos íons hidroxilas da hidroxiapatita provavelmente está relacionado a interação entre este e os grupos hidroxilas e aminas da quitosana. O tipo de quitosana utilizada na confecção dos compósitos não interferiu no perfil dos espectros.

Outro indicio de formação do compósito está na presença de picos em 1654 cm^{-1} apenas nos compósitos, constatando que há formação também de ligações de hidrogênio entre $-\text{NH}_2$ e $-\text{OH}$, semelhante ao que é encontrado em componentes do tecido ósseo (LI, SUN, *et al.*, 2011).

Um exame minucioso dos Grupos III, IV, V e VI (aqueles que contem AE) apontam diferenças entre eles. São visualizados picos referentes a cetonas, em 1682 e 1684 cm^{-1} , ácido carboxílico, em 1704 e 1702 cm^{-1} , e ácido carboxílico saturado, em 1718 cm^{-1} , apenas nos grupos e na amostra precursora com maior teor de AE. A presença destes grupos funcionais leva a sugerir que, nesta razão, o AE pode estar em excesso, o que poderá alterar algumas das características dos compósitos após seu preparo, e conseqüentemente, afetar suas propriedades. O julgamento desta hipótese

poderá ser realizado com o auxílio de outras técnicas de caracterização, tais como, o TG.

A análise no infravermelho dos compósitos seguiu-se com a análise detalhada dos principais picos e bandas surgidos em seus espectros, e são listados na Tabela IV.2 abaixo.

Tabela IV.2. Comprimentos de onda característicos das hidroxiapatitas e dos compósitos.

GRUPOS FUNCIONAIS	GI	G II	G III	G IV	G V	GVI
O-P-O	472	472	474	474	-	-
-PO₄³⁻	564 602 960 1044 1094	564 602 960 1038 1094	566 602 962 1038 1094	566 604 960 1040 1094	565 601 962 1033 1043 1093	567 601 962 1031 1043 1093
Estiramento assimétrico C-O-C (polímeros)	1156	1152	1154	1156	1153	1159
CO₃²⁻	1420	1420	1412 1422	1412 1422	1413	1417
CH₃- e CH₂-	1458 -	1458 -	1460 2850 2918	1458 2850 2920	- 2850 2916	- 2848 2914
-COO⁻Ca⁺ (HAP)	1544	1544	1524 1544	1526 1544	1529 1554	1541 1559
-OH (água adsorvida/HAP e polímeros) / Deformação axial de C=O de amida I (polímeros)	1638	1638	1628 1638	1626 1638	1631	-
Amida	1652	1652	1652	1652	1656	1654
Cetona	-	-	1682	1684	-	-
-COOH	-	-	1702 1718	1702 1718	-	-
-OH (água adsorvida/HAP e polímeros) e NH₂(polímeros) / Estiramento vibracional	3460	3462	3454	3458	3340 3442	3390 3435
Estiramento -OH (constituição/HAP)	632 3566	634 3564	632 3568	632 3568	634 3570	632 3568

IV.1.5. TERMOGRAVIMETRIA (TG/DTG)

A termogavimetria, ou análise termigavimétrica (TG), é utilizada na observação da estabilidade de um material através da variação de massa frente a alterações de temperatura/tempo sob uma atmosfera controlada. Diversas informações a respeito da física e química de um material podem ser extraídas a partir da análise destes resultados (ANTUNES, 2003).

A TG é considerada a metodologia mais importante na avaliação da estabilidade térmica de polímeros e seus derivados (ARCHANA, SINGH, *et al.*, 2013), por isto foi utilizada na averiguação da contribuição do componente polimérico na produção dos compósitos, bem como, avaliar a influência da concentração do agente modificador de superfície no recobrimento das partículas de HAP, e na produção dos compósitos.

As curvas de TG/DTG das hidroxiapatita e do AE estão apresentadas nas Figuras IV.12 e IV.13, e suas perdas de massa e respectivas temperaturas descritas ao longo do texto. As perdas de massa associadas a HAP-P foram relativamente baixas, e exibiram dois eventos de perda em porcentagem menor que 2%, sendo a primeira perda de 1,74%, na faixa de temperatura entre 32 e 247°C com $T_{\text{pico}} = 54^{\circ}\text{C}$ na curva de DTG, com a segunda perda de 0,62%, a partir de 250°C com $T_{\text{pico}} = 759^{\circ}\text{C}$ na curva de DTG. Por tratar-se de um produto higroscópico, a primeira perda ($\Delta m = 1,74\%$) corresponde a liberação de água adsorvida e água da constituição do material (KALITA, VERMA, 2010). A segunda perda apresenta um percentual de 0,62%, estando relacionada a decomposição de seus constituintes e eliminação de grupos/íons carbonáceos (SUN, LIM, *et al.*, 2010; WILSON JR., HULL, 2008; BAYBAS, ULUSOY, 2012).

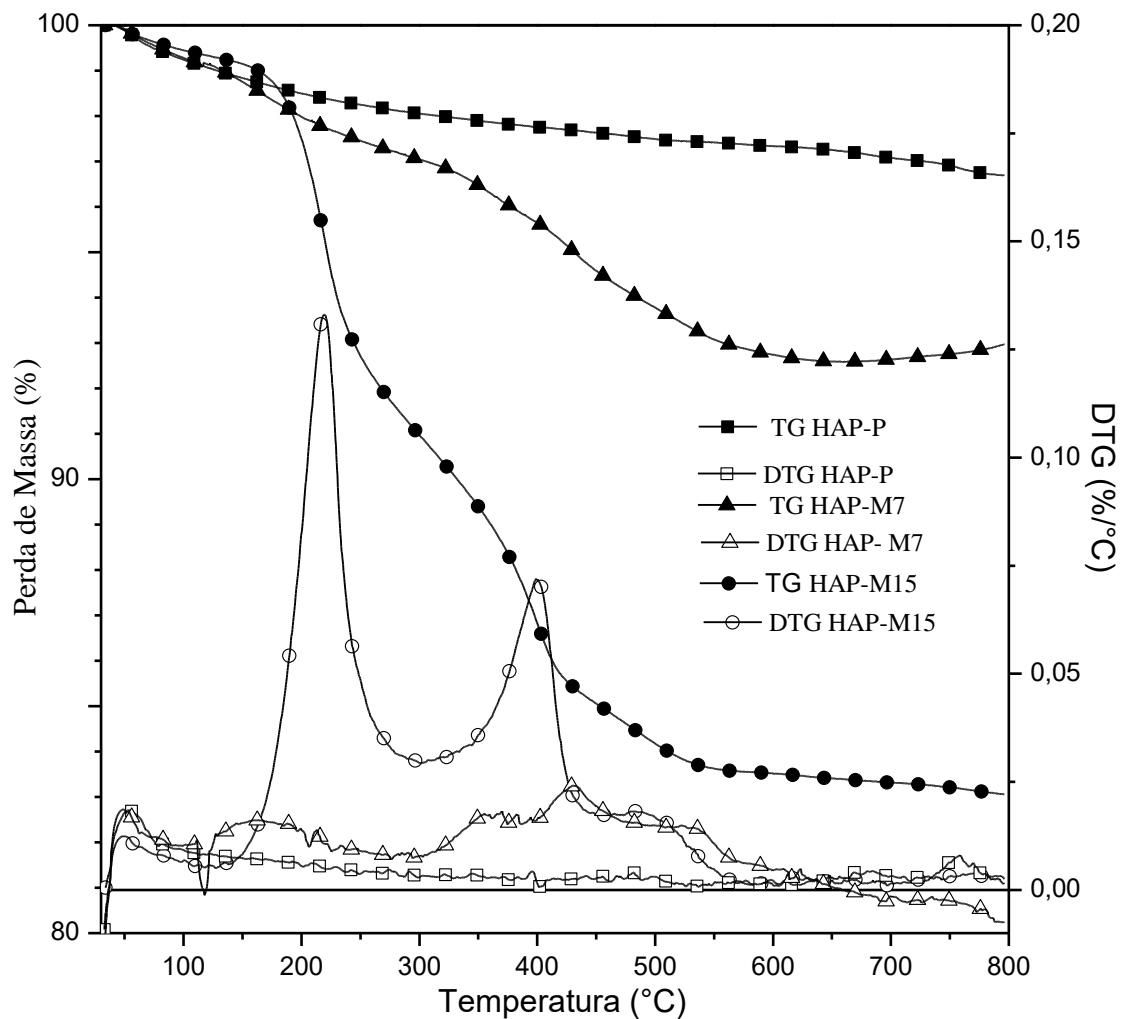


Figura IV.12. Curvas de TG e DTG para a HAP-P, HAP-M15 e HAP-M7, obtidas na razão de aquecimento de 10°C/min em atmosfera de argônio, fluxo de gás de 60 mL/min.

KUMAR, SRINIVASAN, *et al.* (2011) produziram hidroxiapatita cuja perda de massa foi invariável ao longo da temperatura. Eles atribuíram a alta estabilidade térmica como característica das nanopartículas de HAP. No trabalho de SON, APPLEFORD, *et al.*, (2011), nenhuma mudança na porcentagem de resíduos para a HAP isolada foi visualizada. As perdas de massa significativas para a hidroxiapatita ocorrem a temperaturas altas, acima do 850°C, com a perda de grupos hidroxilas (OTHMANI,

AISSA, *et al.*, 2013). O processo de dehidroxilação (perda de grupos hidroxilas) inicia-se quando a amostra é submetida a temperaturas elevadas, acima de 1200°C (ARIFIN, SULONG, *et al.*, 2014), o que confirma os eventos apresentados correspondem realmente a desidratação e eliminação de compostos carbonáceo.

Nota-se a partir das curvas TG/DTG da HAP-M15 (Figura IV.12), que esta apresentou suas perdas de massa mais pronunciadas, quando comparados as da HAP - P. O primeiro, em uma faixa de temperatura entre 34-108°C, indica uma perda de 0,60% atribuída também à evaporação de água (devido ao preparo e armazenamento do material). A segunda, com temperatura entre 134 a 301°C ($T_{\text{pico}} = 220^{\circ}\text{C}$ na curva DTG) e perda de massa de 8,34%, uma terceira perda de 5,91% ($T_{\text{pico}} = 340^{\circ}\text{C}$ na curva DTG) e um quarto processo de perda de massa de 1,15% ($T_{\text{pico}} = 485^{\circ}\text{C}$ na curva DTG) atribuída à decomposição térmica com liberação de dióxido de carbono a partir de material carbonatado da apatita. O segundo e terceiro processos de perda de massa da HAP-M15 podem estar associadas à presença de grupos orgânicos em suas estruturas oriundas do AE. O AE apresentou apenas uma perda de massa ($\Delta m = -99,5\%$) com T_{pico} em 263°C na curva DTG (Figura IV.13). A funcionalização levou a adição de grupos orgânicos à superfície do composto inorgânico ocasionando as alterações entre as curvas de TG/DTG destas substâncias. Segundo a literatura, a perda de massa do AE ocorre em temperaturas próximas a 297°C relacionados a sua decomposição térmica seguida de eliminação de material carbonáceo (ALMEIDA, COSTA, *et al.*, 2012).

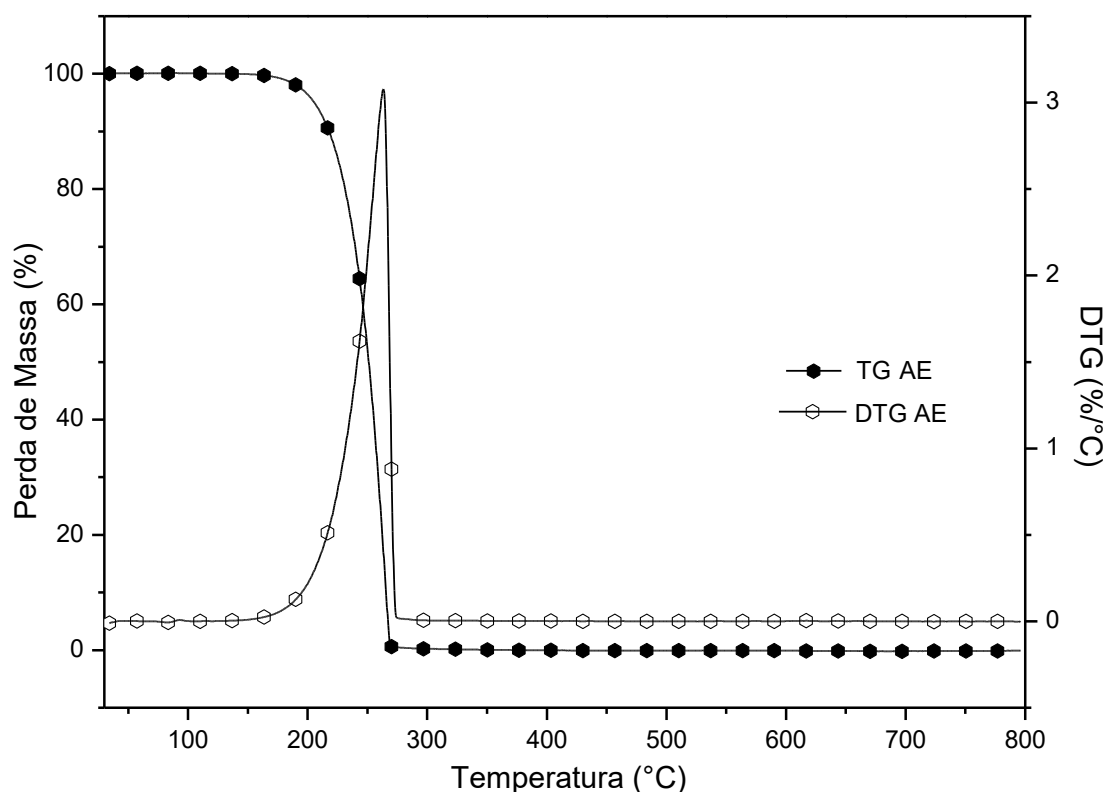


Figura IV.13. Curvas de TG e DTG para o ácido esteárico (AE), obtidas na razão de aquecimento de 10°C/min em atmosfera de argônio, fluxo de gás de 60 mL/min.

Para confirmar a contribuição do AE e entender qual a sua função nos compósitos, uma concentração reduzida de AE foi utilizada na modificação de superfície (7%, p/p) e foi observada a presença dos mesmos eventos descritos para a cerâmica com concentração maior de AE, entretanto, com uma redução brusca na intensidade destes. Resultado esperado, já que a relação de intensidade está e função da concentração do AE. É visto um desmembramento do terceiro evento térmico entre 300 e 600°C em três novos (ver Figura IV.12), estes novos eventos estão sobrepostos. O primeiro evento para a HAP-M7, em $T_{\text{pico}} = 162^{\circ}\text{C}$ na curva DTG, foi deslocado a temperaturas mais baixas (HAP-M15, $T_{\text{pico}} = 216^{\circ}\text{C}$ na curva DTG). Mostrando que a

estabilidade térmica das partículas de HAP de superfície modificada podem estar associadas ao aumento da concentração do AE.

A adição de compostos de base orgânica a superfície de material inorgânico, como a HAP, alterou o perfil térmico. OTHMANI, AISSA, *et al.* (2013) observaram que o aumento da concentração de ácido etidrônico na superfície da HAP promoveu mudanças nas razões de perda de massa. Estas aumentaram com o aumento da concentração do ácido, devido, principalmente, a liberação de material orgânico na decomposição térmica acima de 500°C.

Todas estas alterações em função da quantidade de AE implicam na dedução de algumas hipóteses. A primeira seria a presença de AE livre na amostra e a segunda, a forma sob qual estaria. Quando se correlaciona estes resultados aos relatados na espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IVTF), a primeira hipótese poderia ser confirmada, já que foram visualizados picos adicionais à HAP-M15 e aos compósitos por ele formados.

A Figura IV.14 representa as curvas TG e DTG para as amostras poliméricas (Quitosana AP e BP, e HEC). Foram observados três eventos de perda de massa para a QAP com $T_{\text{pico}} = 55$ e 303°C na curva DTG, para as duas primeiras perdas. A primeira corresponde à liberação de água adsorvida e de constituição do material ($\Delta m = -12,72\%$) (AZEVEDO, SIZILIO, *et al.*, 2011; SUN, LIM, *et al.*, 2010). A segunda, relacionada ao início da decomposição das cadeias poliméricas da quitosana, apresenta um percentual de 44,76% (ARCHANA, SINGH, *et al.*, 2013; DOU, ZHU, *et al.*, 2011). Observa-se também o início de um terceiro evento em 418°C , através do declínio da curva TG da amostra, porém, ao observarmos o DTG não é possível inferir a T_{pico} . Certamente, esta perda está associada à eliminação de material carbonáceo (AZEVEDO, SIZILIO, *et al.*, 2011). O início da decomposição térmica da quitosana dá-se pela quebra aleatória de suas ligações glicosídicas e formação de pequenos ácidos graxos de 2, 3 e 6 carbonos (SAMANTA, RAY, 2014). O perfil térmico da QBP mostra-se semelhante, contudo como grau de pureza deste material é baixo, as porcentagens de perdas de massa

apresentaram-se diferentes: 1ª perda - $T_{\text{pico}} = 48^{\circ}\text{C}$ na curva DTG e $\Delta m = -9,06\%$; 2ª perda - $T_{\text{pico}} = 297^{\circ}\text{C}$ na curva DTG e $\Delta m = -51,26\%$; 3ª perda - $T_{\text{pico}} = 621^{\circ}\text{C}$ na curva DTG e $\Delta m = -25,05\%$.

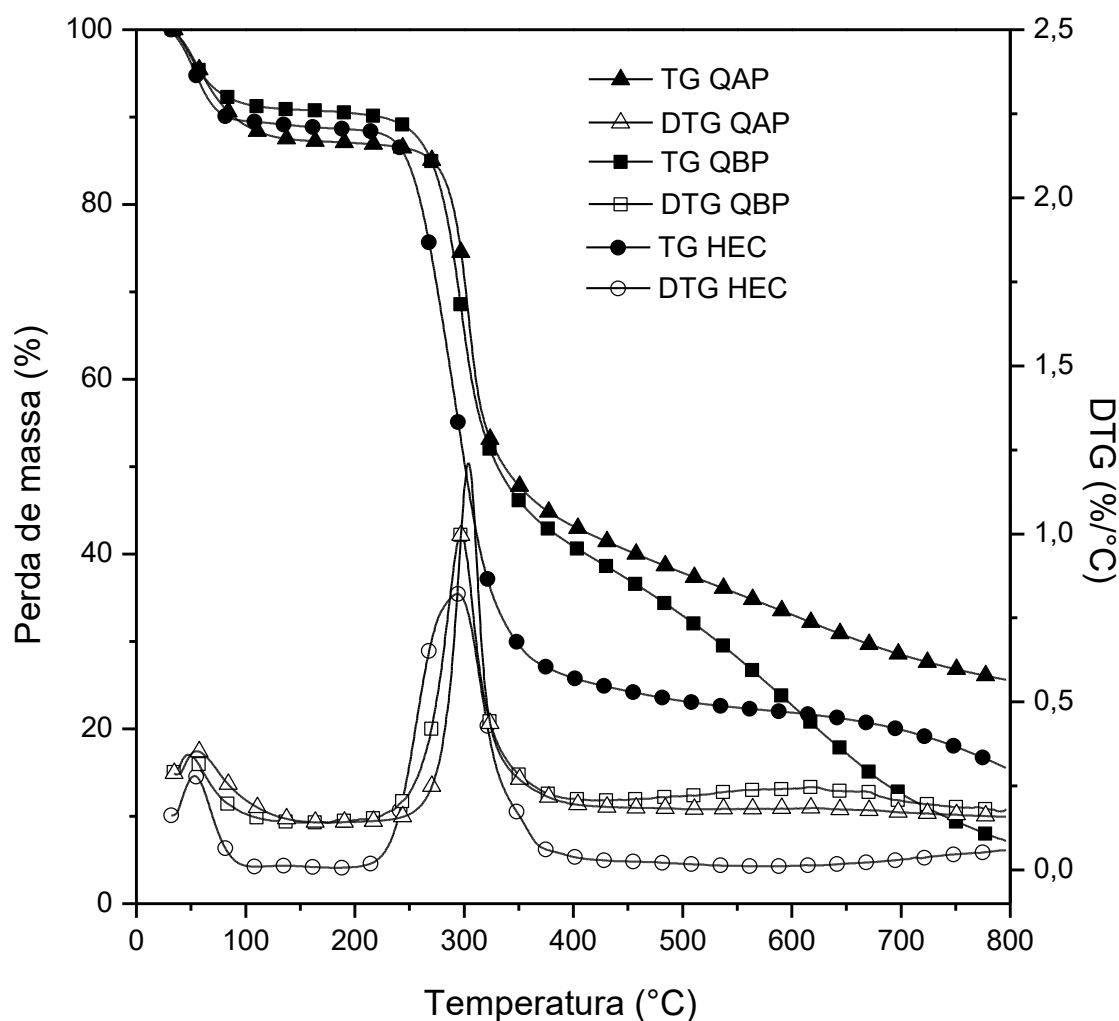


Figura IV.14. Curvas de TG e DTG para a QAP, QBP e HEC, obtidas na razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ em atmosfera de argônio, fluxo de gás de $60 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

Por apresentar uma estrutura química bastante semelhante as quitosanas, o HEC (Figura IV.14) também apresentou três perdas de massa: 1ª perda - $T_{\text{pico}} \text{ DTG} =$

53°C e $\Delta m = -10,60\%$; 2ª perda – $T_{\text{pico}} \text{ DTG} = -294^\circ\text{C}$; e assim como demonstrado na curva TG da QAP, apenas o início do terceiro evento de perda, correspondente a eliminação de material carbonáceo, pode ser visualizado (KALYANI, SMITHA, *et al.*, 2006). Os derivados de celulose apresentam o mesmo perfil de decomposição térmico, com início de quebra da cadeia do polissacárido a temperaturas acima de 400°C (HE, CHANG, *et al.*, 2012).

Com o intuito de averiguar a interferência dos constituintes na interação e formação dos compósitos na estabilidade térmica, a TG também foi utilizada para os grupos de compósitos. As Figuras IV.15 e IV.16 exibem o perfil térmico dos compósitos agrupados pelo tipo de quitosana (QAP e QBP) utilizada.

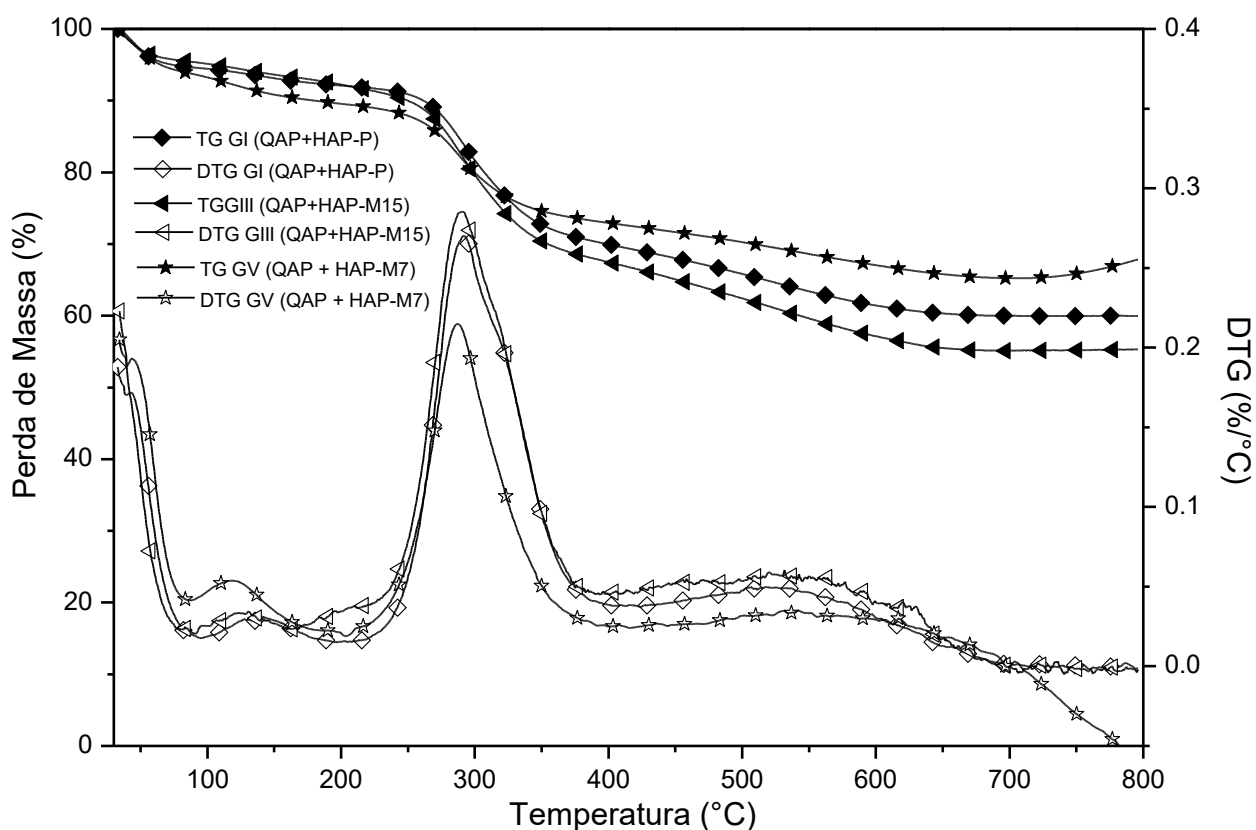


Figura IV.15. Curvas de TG e DTG para o GI, GIII e GV, obtidas na razão de aquecimento de 10°C/min em atmosfera de argônio, fluxo de gás de 60 mL. min⁻¹.

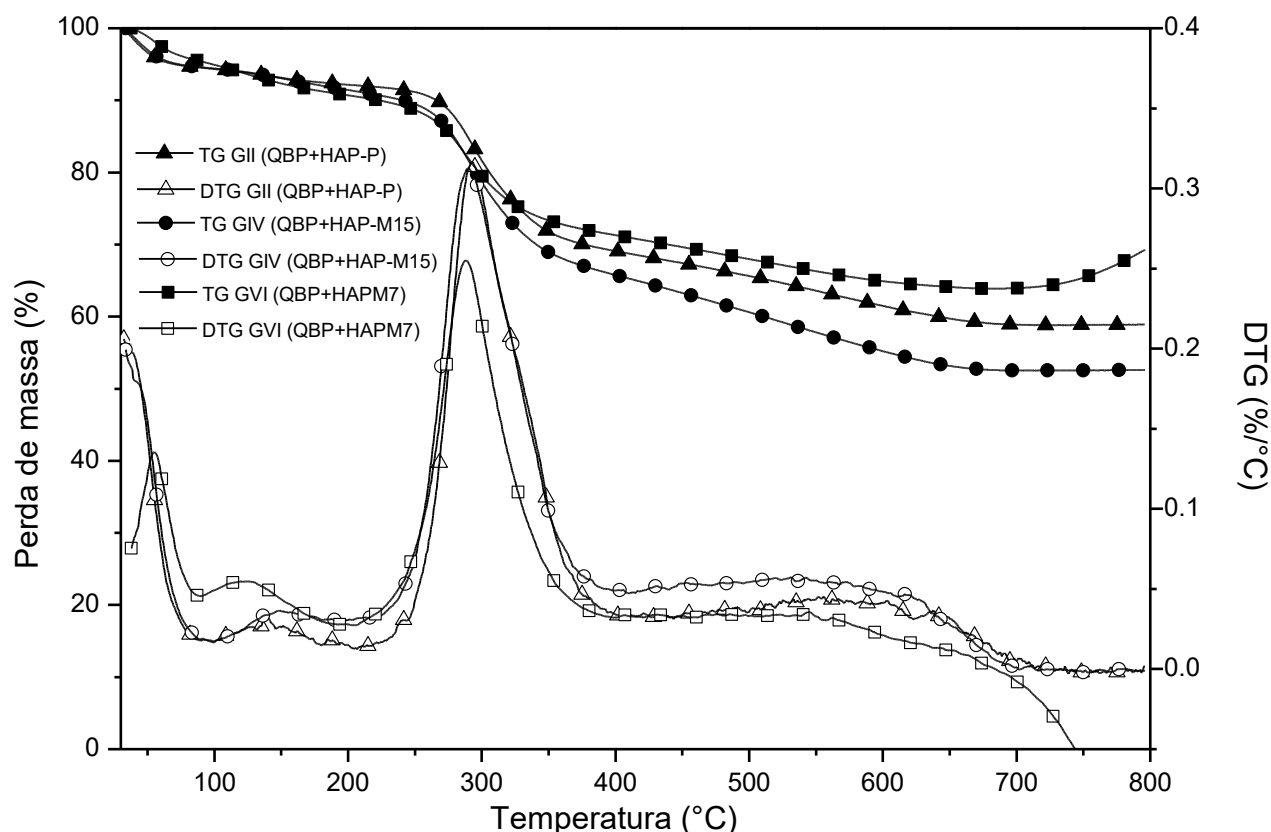


Figura IV.16. Curvas de TG e DTG para o GII, GIV e GVI, obtidas na razão de aquecimento de 10°C/min em atmosfera de argônio, fluxo de gás de 60 mL. min⁻¹.

As curvas TG/DTG do compósito GI apresentaram quatro eventos de perda de massa com os seguintes percentuais e faixas de temperatura: 33 – 95°C ($\Delta m = -5,47\%$), 95-203°C ($\Delta m = -2,46\%$), 214-412°C ($\Delta m = -22,38\%$) e 412-711°C ($\Delta m = -9,53\%$). Todas as curvas apresentaram quatro eventos de perda de massa em faixas semelhantes de temperatura (ver Tabela IV.3 e Figuras IV.15 e IV.16). A formação de uma estrutura interligada por ligações químicas iônicas entre a hidroxiapatita e a quitosana promoveu modificação no perfil térmico dos compósitos, já que a HAP isolada não contribui significativamente nas perdas, pois sua maior perda está associada à desidratação. Somente através da interação e formação de novos grupos químicos entre a carga inorgânica e o polímero é que o perfil térmico altera, originando novos eventos de perda de massa.

Os Grupos III, IV, V e VI, além da quitosana, HEC e HAP, apresentam fragmentos de AE derivado da modificação da superfície da hidroxiapatita. Quando comparados os Grupos I e III, por exemplo, as diferenças se intensificam no 3° e 4° eventos. Este fenômeno pode estar associado ao tipo de interação ocorrida na formação do compósito na presença do AE.

Tabela IV.3. Valores de perdas de massa e faixas de temperatura em que ocorreram para cada compósito.

	1° EVENTO		2° EVENTO		3° EVENTO		4° EVENTO	
	°C	%	°C	%	°C	%	°C	%
GI (QAP+ HAP-P)	33-95	5,47	95-203	2,46	214-412	22,38	412-711	9,53
GII (QBP + HAP-P)	32-94	5,54	94-203	2,35	203-422	23,77	422-747	9,5
GIII (QAP + HAP-M15)	34-90	4,63	90-163	2,08	163-404	26,00	404-705	12,13
GIV (QBP + HAP-M15)	34-98	5,56	98-191	2,74	191-409	25,60	409-722	12,80
GV (QAP + HAP-M7)	30-80	5,94	80-192	4,33	192-406	16,94	406-783	5,66
GVI (QBP + HAP-M7)	30-87	4,47	87-194	4,69	194-399	19,52	399-788	2,09

O aumento da quantidade de AE na composição da HAP alterou a quantidade de resíduos formados a cada faixa de decomposição térmicas. Comparando-se o GIII e o GV observa-se que a partir do 2° evento a quantidade de material decomposto é maior quando a concentração do AE é maior. Fenômeno presumível, já que o aumento da quantidade de AE aumentará a quantidade de grupos orgânicos a serem decompostos.

O Grau de pureza do polímero não modificou o perfil das curvas de TG dos compósitos. A exemplo, os Grupos V e VI tiveram seus percentuais de decomposição

alterados em três dos quatro eventos, com alternâncias dos valores de massa devido ao tipo de quitosana. Um outro ponto observado ainda sobre os Grupos V e VI é a redução da temperatura de decomposição de 406°C para 399°C.

Normalmente, observa-se nos trabalhos da literatura que a alteração da composição modifica a estabilidade térmica do material, o que foi observado para os compósitos produzidos nesta tese. Entretanto, o aumento da estabilidade está associado ao aumento da carga inorgânica na composição, com o deslocamento do início da decomposição (KUMAR, SRINIVASAN, *et al.*, 2011; HE, CHANG, *et al.*, 2012). Na presente tese, a concentração de componentes orgânicos foi aumentada, e consequentemente a estabilidade foi alterada.

IV.1.6. POROSIDADE POR IMERSÃO

Os compósitos esponjosos foram preparados a partir de uma mistura de polímeros (QUI e HEC) com diferentes tipos de HAP (P, M7 e M15) seguindo o procedimento técnico por congelamento seguido de liofilização. A Figura IV.17 apresenta a razão de porcentagem de poros nos compósitos em função de sua composição. Os dados foram calculados seguindo o *princípio de Arquimedes*, de variação de volume de solvente de imersão promovida pelas diferentes densidades dos arcabouços (detalhes das equações na seção de descrição da metodologia).

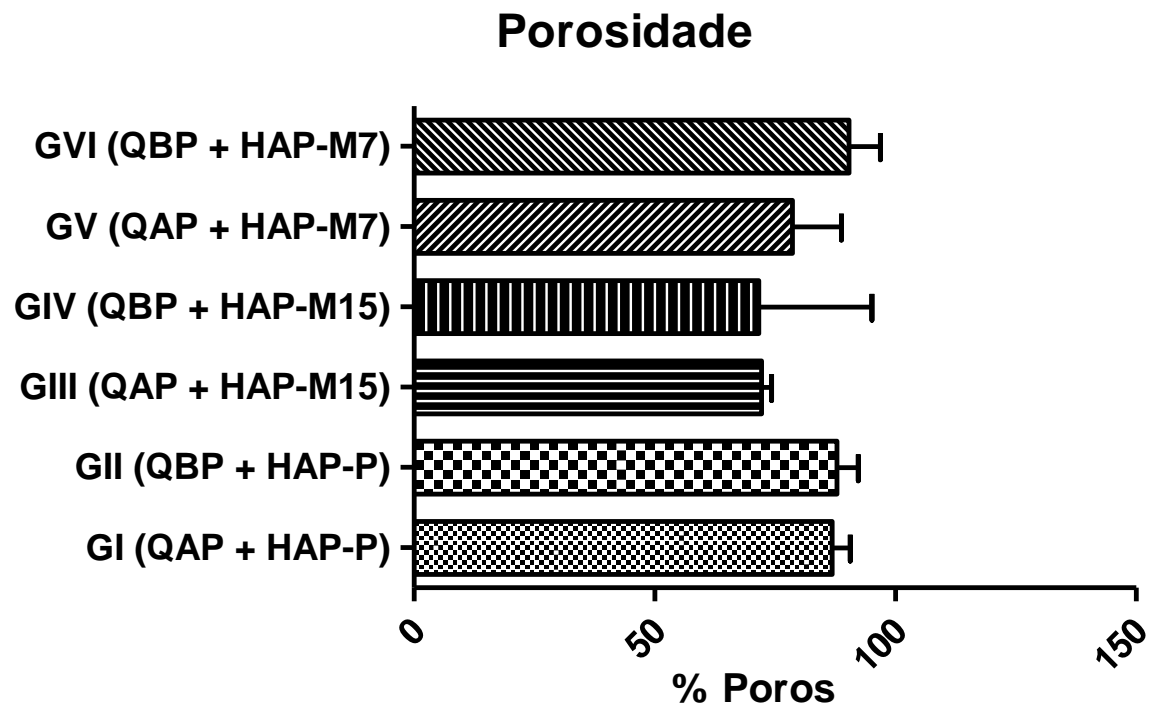


Figura IV.17. Gráfico da porosidade dos diferentes compósitos.

Nenhuma diferença significativa ($p < 0,05$) da media comparada entre si usando Anova de uma via com pós-teste de *Tukey*.

Observa-se que o grau de porosidade das amostras permaneceu entre 71 e 90%, demonstrando que a metodologia de confecção dos compósitos origina estruturas extremamente porosas, estabelecendo mais um requisito para a biocompatibilidade (presença de poros para o crescimento celular). A porosidade relatada na literatura pode variar de 24 a 96%.

O tipo de quitosana não contribuiu significativamente para a mudança de porosidade dos arcabouços. Examinando os grupos GI e GII, por exemplo, a variação de poros entre eles foi de -1,02 com $p < 0,05$ já que em média, apresentaram-se como GI = 86,85, e desvio padrão de 3,75; e o GII = 87,87, e desvio padrão de 4,45.

As partículas de HAP por si só apresentam impacto significativo na porosidade de arcabouços. Materiais poliméricos apresentam baixa taxa de formação de poros,

devido a uma maior reticulação de rede e compactação das fibras que se reorganizam durante o congelamento, e permanecem durante e após a liofilização. A adição de elementos extras promove extensão das cadeias, e alargamento das cavidades ou formação destas. SHIMOJO, PEREZ, *et al.* (2012) observaram que o aumento de um dos componentes do híbrido de estudo (ácido hialurônico e quitosana) promovia a um maior número de poros. KUCHARSKA, BUTRUK, *et al.* (2012) verificaram que o acréscimo no teor de TCP em arcabouços de quitosana promovia, além de mudanças na micro e macro arquitetura com ordenamento dos poros, como também a porcentagem de poros.

Infere-se da Figura IV.17 que apesar de não serem observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) na quantidade de poros, é evidente que a porosidade foi afetada pela composição das amostras. Os grupos que apresentam AE em suas composições (GIII, GIV, GV e GVI) apontam uma estrutura menos porosa comparada aos grupos em sua ausência (GI e GII). A redução da porosidade pode estar associada ao aumento da densidade promovida pelo AE. Como já relatado, o AE é um lipídeo e sua inserção sob a superfície da HAP acarreta no aumento do tamanho da partícula, e isto estimula ao aumento da densidade destas partículas. Este, por conseguinte, reduz a porcentagem de poros do material. Foi o que FANG, FENG (2014) observaram ao produzir compósitos pelo recobrimento de HAP com ácido poli-L-lático (PLLA). Eles perceberam que o aumento da proporção de HAP no sistema promovia um aumento da densidade do compósito, por consequência, a densidade de poros era reduzida. HUNGER, DONIUS, *et al.* (2013) constataram que alterações de volume e número de poros de arcabouços foram ocasionadas pelo simples aumento de tamanho de partículas. Deste modo, os resultados apresentados na Figura IV.17 implica que o tamanho da partícula e a composição dos compósitos são os responsáveis pela redução da porosidade destes materiais.

IV.1.7. INTUMESCIMENTO

A Figura IV.18 apresenta a razão de intumescimento de todos os materiais avaliados: arcabouços de polímero e dos compósitos. A habilidade em intumescer dos compósitos foi avaliada em tampão fosfato pH 7,4, a 37°C por 24 horas.

Todos os compósitos avaliados apresentaram alta absorvidade, e a razão de intumescimento foi determinada pela composição de cada grupo, principalmente, decorrente da mudança de composição, grau de pureza da quitosana e da concentração de AE utilizada.

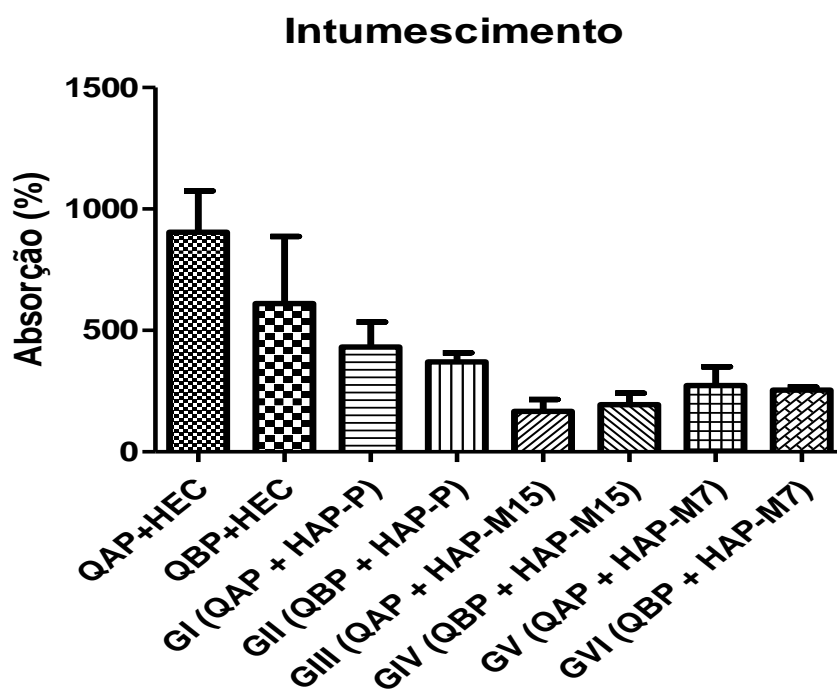


Figura IV.18. Perfil de intumescimento dos arcabouços de polímeros e dos compósitos após 24 horas e em tampão fosfato pH 7,4 a 37°C.

++ e +++ Diferença significativa ($p < 0,05$) da média comparada com o QAP+HEC usando Anova de uma via com pós-teste de *Tukey*.

ns Nenhuma diferença significativa ($p < 0,05$) da media comparada com o QBP+HEC usando Anova de uma via com pós-teste de *Tukey*.

*Diferença significativa ($p < 0,05$) da média comparada com QBP+HEC usando Anova de uma via com pós-teste de *Tukey*.

Como esperado, os arcabouços Quitosana+HEC (QAP+HEC e QBP+HEC) apresentaram alta absorvidade ao tampão fosfato, acima de 600% de seu peso original. Como discutido previamente, polímeros formadores de hidrogéis tem a habilidade de intumescer em ao menos 20% de seu peso após imersão em um fluido, com ou sem o auxílio de aditivos. Para o arcabouço de quitosana e hidroxietilcelulose, os grupos positivamente carregados estão mais disponíveis a interagir com os íons fosfato do tampão, quando comparados aos arcabouços dos compósitos. Ocorre uma repulsão eletrostática, devido a ionização destes grupos, ocorrendo um afastamento das cavidades do polímero e, conseqüentemente, um aumento de conteúdo introduzido. Esta prerrogativa foi determinante no valor de absorção observado. Não somente a presença de grupos aminas da quitosana podem ter influenciado, mas também a presença de grupos carboxílicos abundantes nas estruturas derivadas da celulose, como a quitosana e o HEC.

SAMANTA, RAY, 2014 afirmam que este tipo de interação promove um aumento na razão de equilíbrio de intumescimento por alteração do pH do meio. Segundo eles, a redução do pH ocorre também sob a neutralização dos grupos carboxílicos. OBAIDA, BADER, *et al.*, 2011 observaram que os grupos COOH do Carbopol 934, um poliacrilato rico em grupos carboxílicos, foram importantes para o aumento do intumescimento de membranas mucoadesivas para o tratamento de candidíase. No trabalho, os autores reafirmam que a capacidade de inchar sob influência de líquidos pode levar ao polímero um ganho de massa em até 1000 vezes.

Quando confrontados os resultados para a pureza da quitosana, observa-se que não há diferença estatística significativa para $p < 0,05$, provavelmente, devido ao grande desvio padrão ($\pm 270\%$).

Aplicando-se a análise estatística ANOVA, seguido do *post-test* de Tukey, observa-se que a presença de hidroxiapatita, independentemente do tipo, foi suficiente para alterar o perfil de intumescimento.

O comportamento de intumescimento dos compósitos apontou um diferente perfil, com valores em porcentagem menores. A presença da HAP alterou o volume de absorção devido a eficiência de reticulação do polímero, pois nestes, o número de grupos químicos anteriormente disponíveis foi agora substituído por ligações químicas de hidrogênio e iônicas com a HAP (ver resultados do IVTF). Na estrutura do compósito, as partículas de HAP dispersas aleatoriamente sob a superfície do polímero pode ter promovido uma contração e restrição da mobilidade das cadeias da quitosana, desfavorecendo o intumescimento. Hidrogéis que formam ligações cruzadas com outros materiais apresentam uma estrutura mais rígida e não intumescem da mesma forma comparados aos mesmos hidrogéis sem estas ligações.

ZHANG, WANG, *et al.* (2010) mostraram que a presença de micropartículas de HAP interferiu na redução do inchaço do arcabouço de alginato de sódio devido as interações ocorridas entres estes componentes pela simples presença de íons fosfato e carboxílicos destas estruturas, respectivamente.

PETER, GANESH, *et al.* (2010) observaram que o aumento da quantidade de polímero afetou diretamente na absorção e que na interação do polímero e nanopartículas de HAP ocorridas pela ligação de NH_2 e íons Ca, o grupo hidroxila não formaria ligações de hidrogênio, contribuindo na redução do intumescimento.

Os grupos GI e GII não apresentaram diferença estatística significativa, reforçando que o tipo de quitosana utilizada não interferiu nesta propriedade.

A incorporação do AE promoveu uma maior redução na capacidade do arcabouço em intumescer. Duas características podem ter contribuído para este resultado. Ela baseia-se na relação de hidrofobicidade dos lipídeos em meio aquoso. O AE é um lipídio de cadeia curta utilizado em formulações cosméticas na obtenção de

emulsões para veiculação de componentes oleosos. A segunda é que o AE pode ter aumentado a densidade do material e protegeu da infiltração da água.

Um maior teor de AE poderia promover uma menor interação da partícula de HAP com o polímero, o que facilitaria a permeação do tampão entre as cavidades porosas do arcabouço, tornando-o mais favorável ao intumescimento. A liberação facilitada das partículas de HAP-M15 poderia contribuir também para a maior disponibilidade de grupos químicos da quitosana para interagir com os grupos fosfatos do tampão e promover o inchaço do arcabouço. Entretanto, o aumento da quantidade de AE levou a uma maior retenção da expansão do polímero e, conseqüentemente, a uma menor absorção. A partir da Figura IV.10 (a) foi possível visualizar esta proposição.

Outro fator que pode ter contribuído para estes perfis foi o volume de poros existentes nos arcabouços. Como observado nos resultados de porosidade (Figura IV.17), o aumento desta propriedade ocorre com a presença de HAP e a redução da concentração de AE presente na superfície da HAP. Materiais poliméricos puros, ou seja, na ausência da HAP, a porosidade é maior. Sendo assim, é esperado um alto valor de intumescimento para os arcabouços poliméricos, seguidos dos compósitos com HAP-P, de HAP-M7 e por último, os compósitos de HAP-M15.

Todas as metodologias de caracterização físico-químicas utilizadas para mapear as propriedades dos compósitos levaram a sugerir que apenas mudanças sutis são observadas em função da utilização de dois tipos de quitosana de purezas e GD diferentes. Partindo destas proposições, seguiu-se a observação das propriedades biológicas e da análise de imagens somente com os compósitos de QAP: GI, GIII e GV.

IV.1.8. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A Figura IV.19 apresenta as imagens de MEV das amostras de HAP (P, M7 e M15). Através das imagens verifica-se a presença de partículas de formas e tamanhos

variáveis e dependentes da quantidade de AE. Em geral, o tamanho da partícula atingiu um limite de aproximadamente 250 nm, tamanho máximo observado.

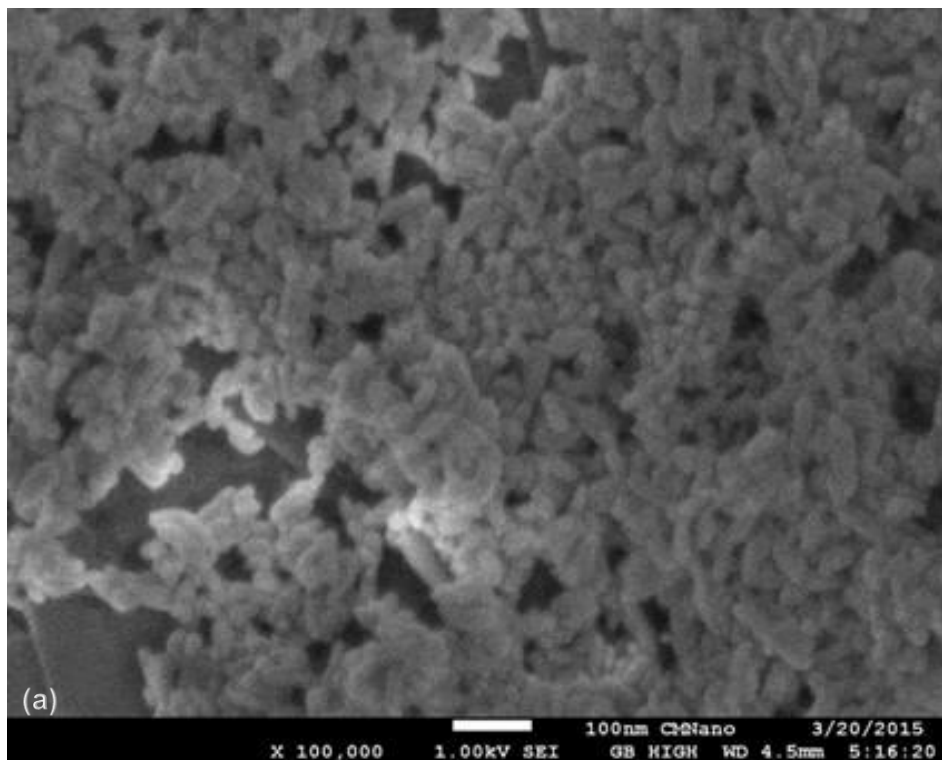
A princípio, as partículas de HAP sem modificação de superfície, HAP-P, exibiram um formato bidimensional do tipo arredondado, formando um conjunto de agregados, mas com contornos distinguíveis, e tamanhos de partículas isoladas inferiores a 100 nm. A reação de precipitação por via úmida, metodologia utilizada na síntese da HAP-P, pode ter contribuído para o aspecto morfológico das partículas.

Ao incorporar o AE a superfície das partículas, o aspecto/tamanho apresentado pelas partículas foi alterado. São visualizadas partículas de formato arredondados, ainda sob influência da agregação, e tamanhos variáveis e inferiores a 150 nm. Estes aglomerados são formados por uma quantidade menor de partículas, comparados a HAP-P. Aumentar a concentração do AE provocou uma maior agregação das partículas, com aumento do volume de partícula, agora entre 50-150 nm, sem uma boa definição dos contornos das partículas, como foi observado para a HAP-P, que pode ter sido provocado pela quantidade excessiva de AE na amostra gerando um material amorfo entre as partículas. O aspecto arredondado para estas partículas assemelha-se as HAP-M7.

O AE adicionado à superfície da HAP atuou como estabilizante de superfície, melhorando a dispersão, através da formação de uma camada de barreira que impede a aproximação de outras partículas. Este processo promoveu um aumento do volume global das partículas com maior concentração do AE, o que colaborou para a observação dos resultados apresentados no EDL. A partir do EDL foi possível observar uma correlação de aumento de tamanho de partícula pelo aumento da concentração do AE. A MEV permitiu integrar os resultados, e sugerir a contribuição do lipídeo para o tamanho e morfologia das partículas de HAP recobertas.

A mudança da morfologia pode ser promovida pela simples modificação de superfície e do tipo de agente modificador e geralmente não afeta a cristalinidade do material. Ao produzir HAP para revestimentos de superfície de enxertos de titânio,

ZHANG, LI, *et al.* (2012), observaram que a presença de AE nestes revestimentos melhorava a uniformidade das partículas, mas a cristalinidade não era afetada. Característica importante que deve ser preservada após a modificação de superfície. Para FERESHTEH, MALLAKPOUR, *et al.* (2015), a modificação da superfície de partículas promove uma alteração da energia de superfície destas, por isso ocorre alteração na morfologia.



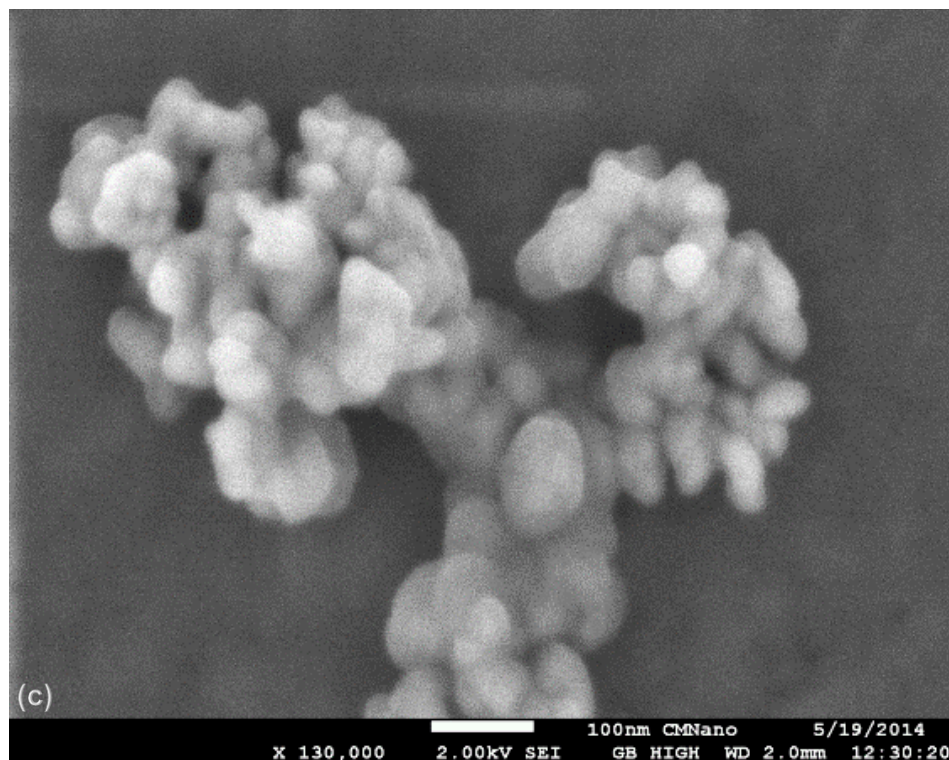
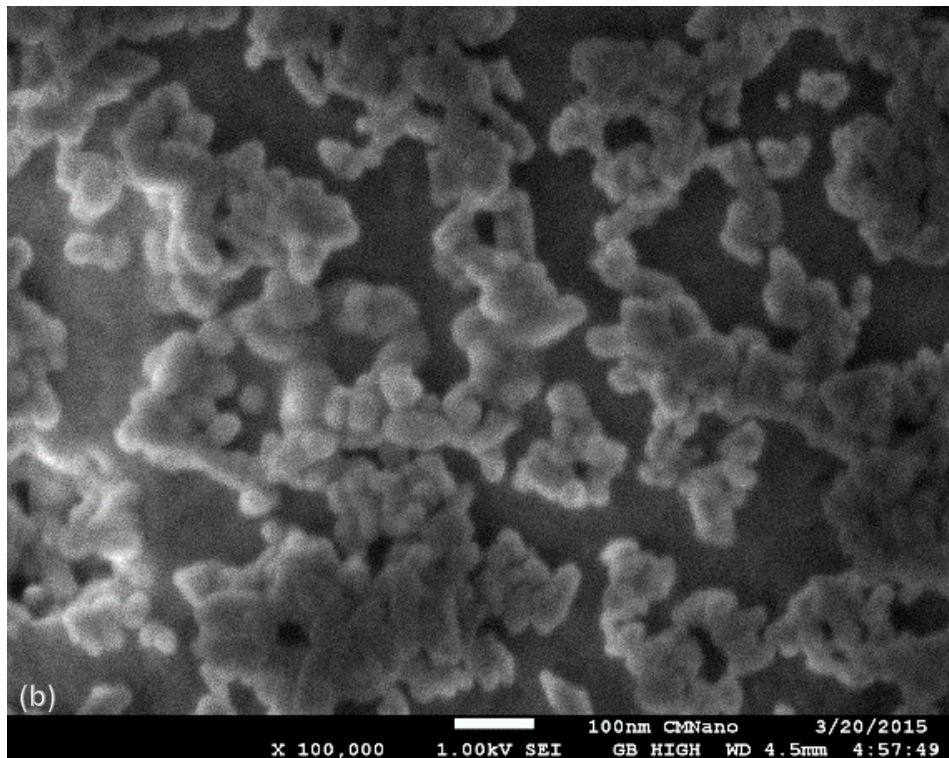


Figura IV.19. Micrografias de MEV da (a) HAP-P; (b) HAP-M7 e (c) HAP-M15.

A Figura IV.20 apresenta imagens de microscopia para o compósito GI expressando a presença dos poros. São encontrados poros de tamanhos e cavidades

irregulares, entre 20 e 100 μm , e interconectados. A afinidade entre os constituintes do compósito é caracterizada pela interconectividade entre eles (Figura IV.20 (b)) e pela dificuldade em estabelecer a interface de interação. Compósitos com arranjo tridimensional são caracterizados por seu formato e a presença de inúmeros canais porosos ao longo de sua estrutura. Algumas técnicas podem ser utilizadas para confiná-los neste formato, dentre elas a liofilização. Liofilizar um material consiste em secá-lo a baixas temperaturas alternando a pressão de sublimação. O processo baseia-se na sublimação de componentes voláteis congelados na estrutura do material. Esta técnica é bastante útil tanto para manter o formato dimensionado durante o congelamento, bem como proteger materiais sensíveis ao calor. A temperatura e tempo de congelamento, aliado a pressão para a sublimação dão características diferentes a estrutura formada (CAI, TONG, *et al.*, 2009; FANG, FENG, 2014).

O tamanho dos poros dos arcabouços tridimensionais pode ser modulado pela temperatura de congelamento e sua orientação pela geometria dos gradientes térmicos durante o congelamento, no pré-processo de liofilização (FU, SAIZ, *et al.*, 2013). No mais, a morfologia é controlada pela composição das cadeias poliméricas e a densidade de reticulação e/ ou emaranhamento da rede (SHIMOJO, PEREZ, *et al.*, 2012).

Durante este processo de secagem por sublimação dos compósitos congelados, os canais aquosos foram substituídos por ar, formando lamelas e canais na estrutura tridimensional. A Figura IV.20 exemplifica esta afirmação e mostra que a distribuição no tamanho de poros é variada.

Arcabouços com porosidades adequadas, entre 50-150 μm , podem ser utilizadas como suporte para a adesão e multiplicação celular e de neovascularização ao longo do enxerto (SARAVANAN, NETHALA, *et al.*, 2011). A regeneração do tecido é facilitada por estes canais porosos por servirem como veículos de passagem de fluidos e nutrientes. A porosidade apresentada pelos compósitos nas micrografias da Figura IV.20 e ilustrada pelos resultados de porosidade da Figura IV.17, demonstra que os compósitos aqui

desenvolvidos podem vir a ser utilizados como biomateriais e podem promover a facilitação da adesão celular.

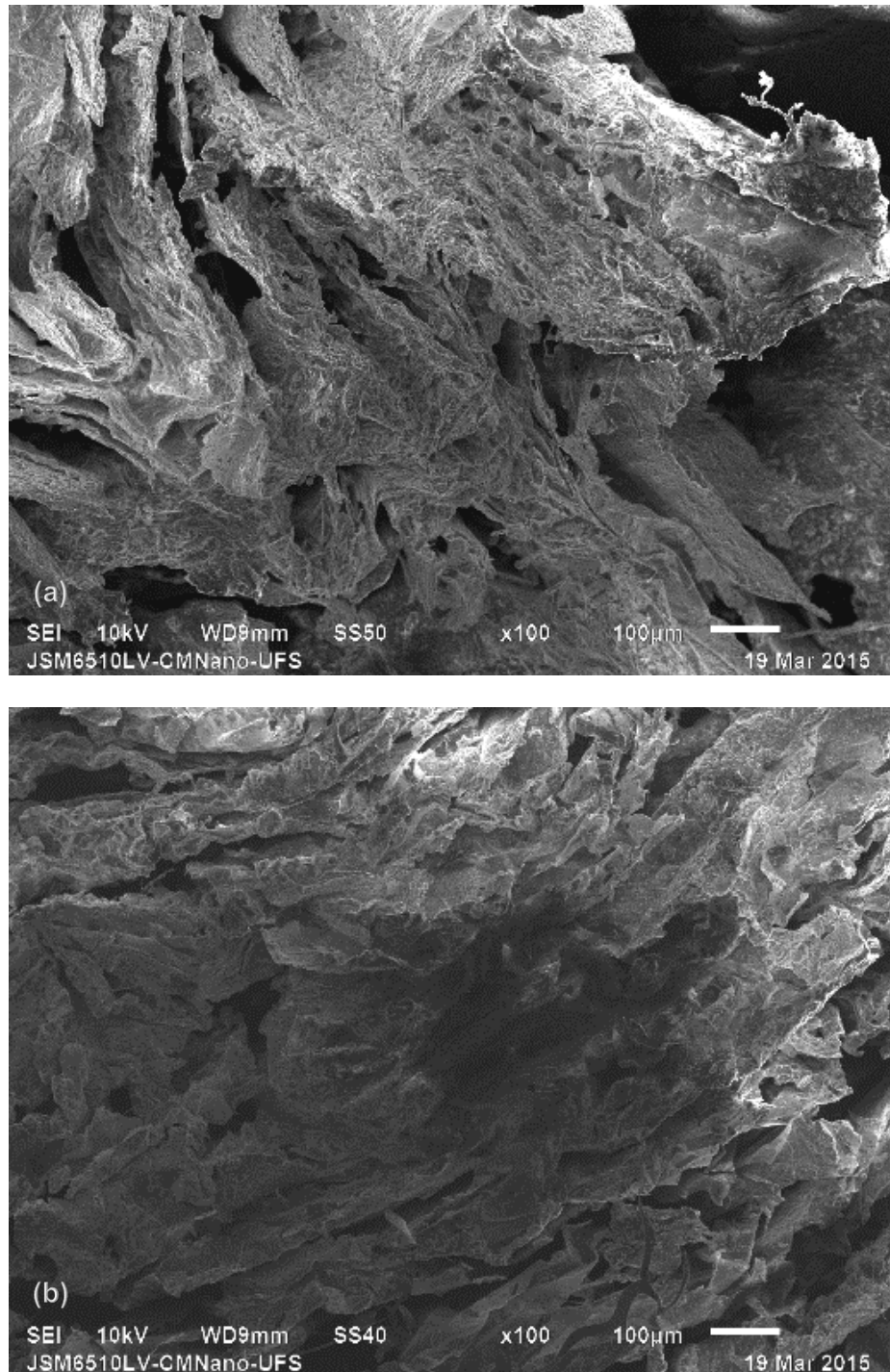


Figura IV.20. Imagens de MEV do compósito GI: (a) poros abertos e (b) poros abertos e interconectados.

Para a comprovação da presença de partículas de HAP sob a estrutura do arcabouço, a espectroscopia de energia dispersiva (EDS) foi utilizada (Figura IV.21). Confirmou-se, então, a presença dos elementos Ca, P, O e C. A alta concentração observada para o átomo de carbono está relacionada aos polímeros, que são essencialmente constituídos de C, H, O e N. A razão Ca/P foi de 1,679, demonstrando que a HAP presente está sob sua forma estequiométrica. As imagens (c) e (d) da Figura IV.21 apresentam o mapa de distribuição dos elementos cálcio e fósforo sob a superfície do arcabouço da imagem (a) da mesma figura. Através delas pode-se observar que a distribuição não é uniforme e centra-se nas partes mais densas do compósito. Espaços vazios são formados, provavelmente, associados aos canais Inter lamelar do arcabouço.

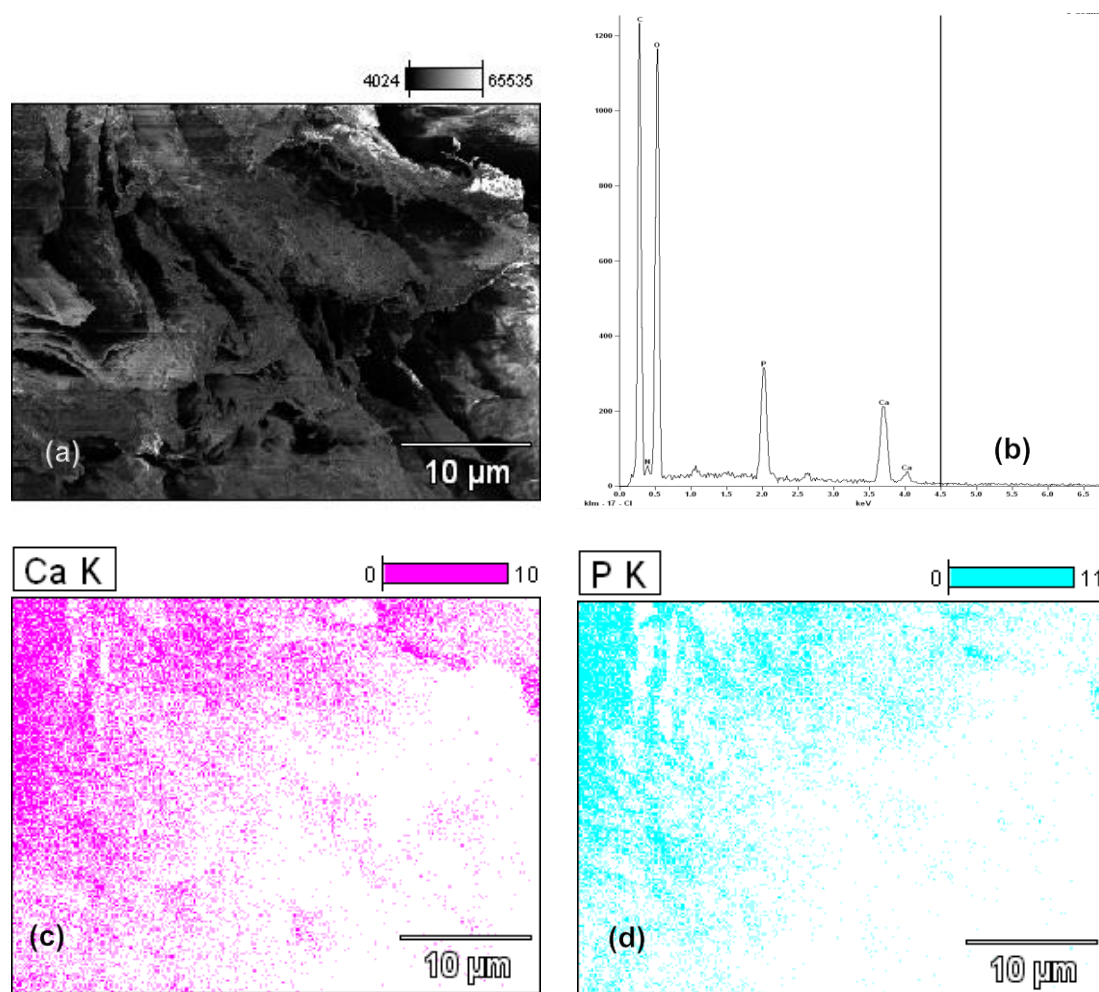
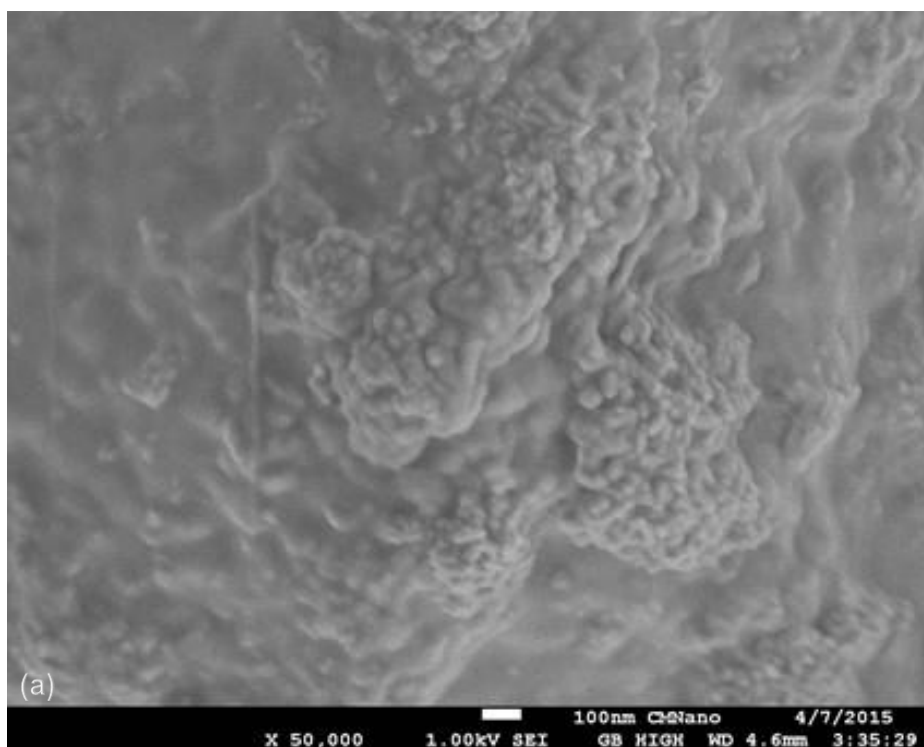
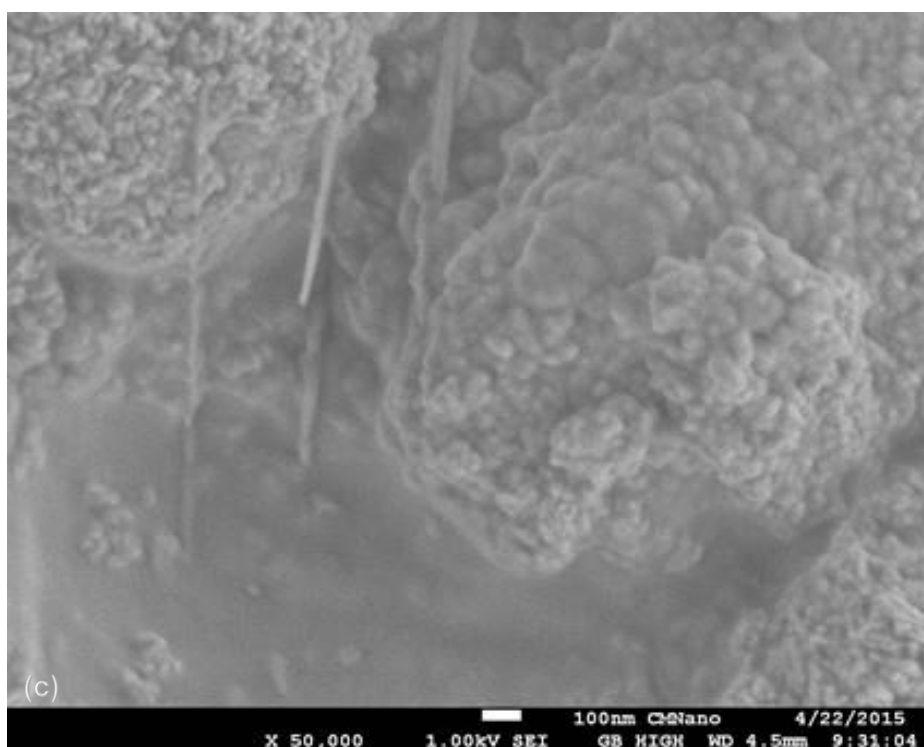
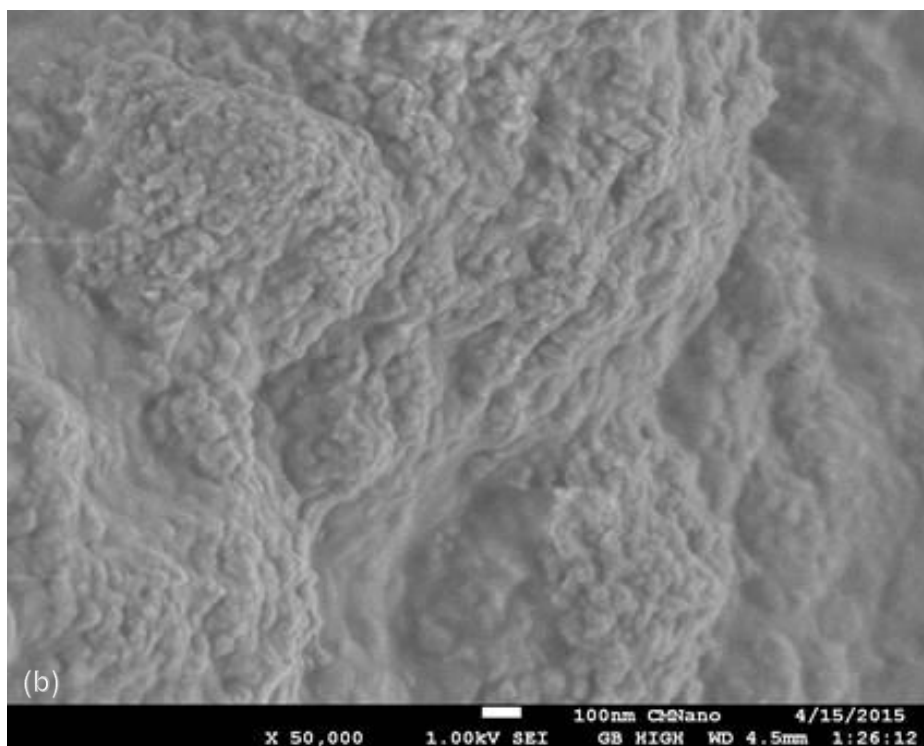
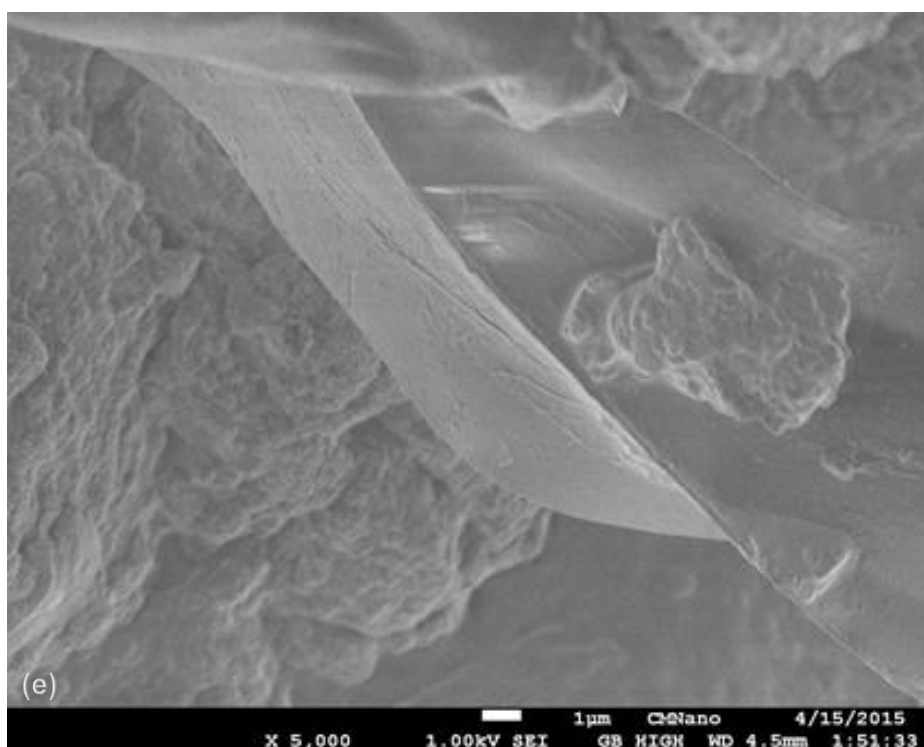
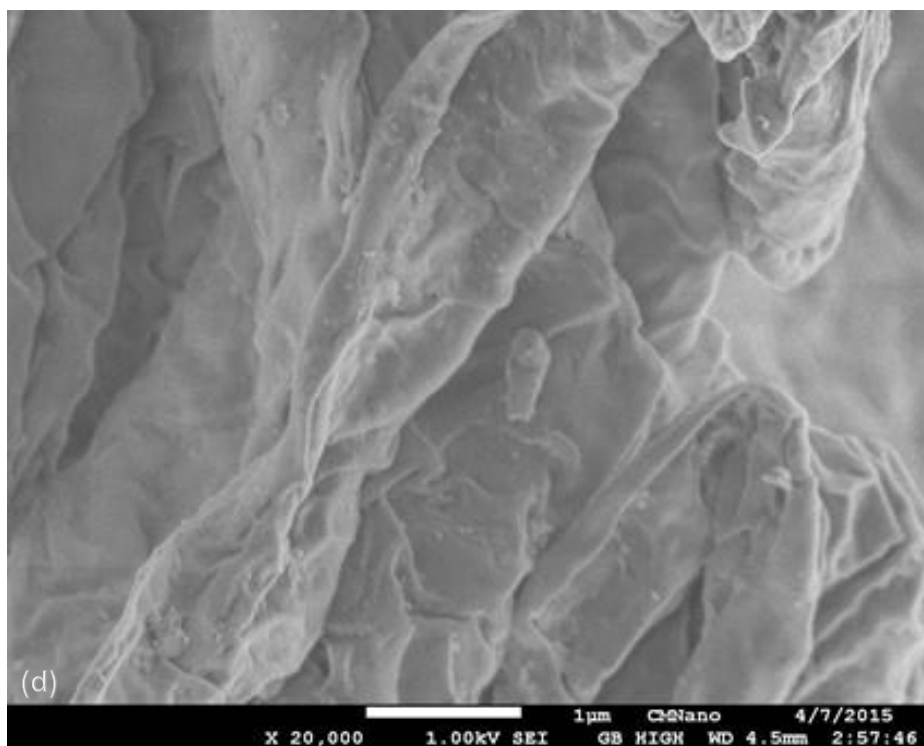


Figura IV.21. Compósito GI: (a) imagem de MEV, (b) gráfico de EDS, (c) e (d) mapa de distribuição dos elementos Ca e P.

Quando em solução, as cadeias poliméricas reorganizam-se através das ligações cruzadas formando uma estrutura em rede. Nesta fase, as partículas de hidroxiapatita encontram-se em suspensão e distribuídas aleatoriamente, com o auxílio da HEC. Após a secagem, as partículas antes dispersas aderem à rede formada pelo polímero, isto pode ser exemplificado através das imagens de microscopias da Figura IV.22.







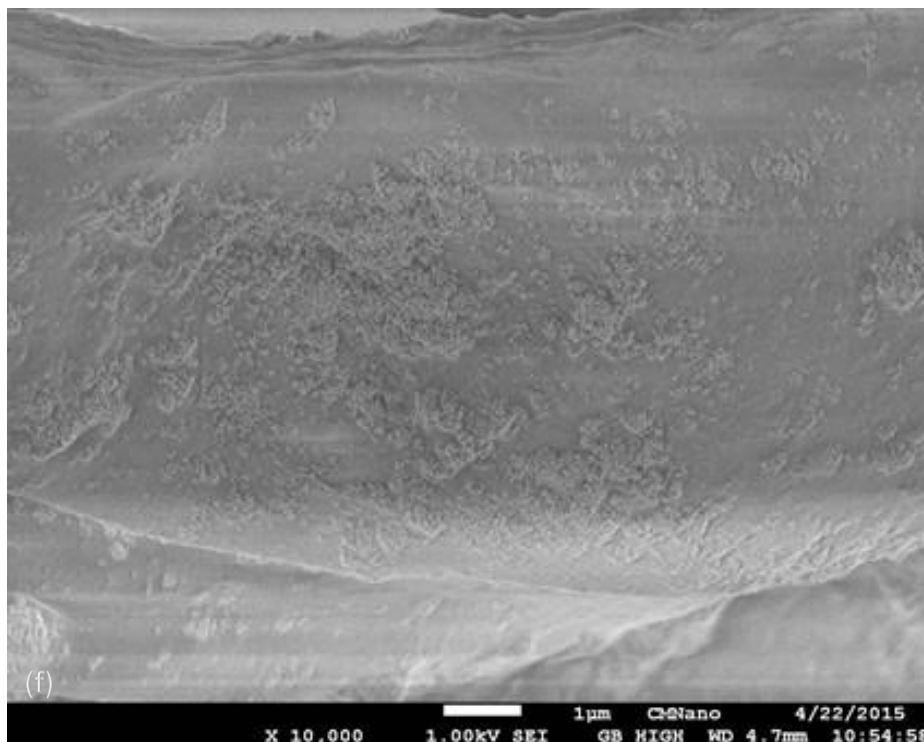


Figura IV.22. Imagens de MEV do compósito GI (a, d), GIII (b, e) e GV (c, f).

A boa distribuição das partículas de HAP no polímero confere ao biomaterial uma excelente bioatividade e osteocondutividade, melhoria nas propriedades mecânicas e uma capacidade de bioreabsorção que pode acelerar a formação do tecido em torno do biomaterial.

O aspecto irregular da superfície, atribuindo certa rugosidade ao biomaterial, é visualizado em todos os compósitos, independentemente de sua composição. Devido a interação superficial entre a HAPe a QAP, a distribuição da carga inorgânica ocorreu de forma aleatória. As partículas de HAP emergiu na superfície do polímero, e devido ao seu entrelaçamento com as fibras poliméricas, seu crescimento, dado a aglomeração de partículas menores, foi limitado. Segundo PIGHINELLI, KUCHARSKA (2013), superfícies irregulares são preferíveis na confecção de materiais de uso biomédico, pois, as células tendem a migrar para superfícies imperfeitas e assim aderir e multiplicar-se.

As imagens de microscopia eletrônica de alta resolução dos compósitos exibias nas Figura IV.22 (d), (e) e (f) indicam a presença de fibras lisas, as quais não sofreram

modificações pela presença das partículas inorgânicas. Possivelmente, nem toda a superfície exposta da rede polimérica tornou-se alvo da aderência da HAP. Talvez, a quantidade de agente dispersante, a HEC, não foi suficiente para a homogeneidade na distribuição de partículas.

Em função da composição, pode-se observar diferenças na distribuição das cargas inorgânicas ao longo das superfícies. Quando estas estavam recobertas pelo ácido esteárico, uma melhor dispersão e poucas regiões vazias são observadas. Diferenças no tamanho e nos aglomerados de partículas também são visualizados, porém, em todos os grupos estes tamanhos circulam os 100 nm.

Pode-se notar em todas as composições a presença de fibras não recobertas pela carga inorgânica, apresentando-se lisas e uniformes. Para o compósito na presença do AE, poucas fibras foram observadas, contudo, para a amostra do GI (constituída de HAP-P), um emaranhado de fibras tornou a superfície deste material diferente das demais. Provavelmente, a presença do AE contribuiu para este formato. A influência do AE foi observada e confirmada através de outras caracterizações físico-químicas discutidas seções anteriores.

IV.1.9. ESPALHAMENTO DE RAIOS X A BAIXOS ÂNGULOS (SAXS)

Os experimentos de SAXS foram conduzidos sob condições que simulassem o processo de liofilização, ao controlar a pressão e a temperatura negativas utilizando-se de aparatos acoplados a linha de SAXS, através da extração de moléculas de solvente ao passo que foram sendo substituídas por ar; e dos arcabouços, como produto final do processo de secagem. A Figura IV.23 apresenta dados de SAXS para os compósitos GI, GIII e GV e para o arcabouço polimérico, antes e após 10 min de experimento em condições de temperatura e pressão controladas.

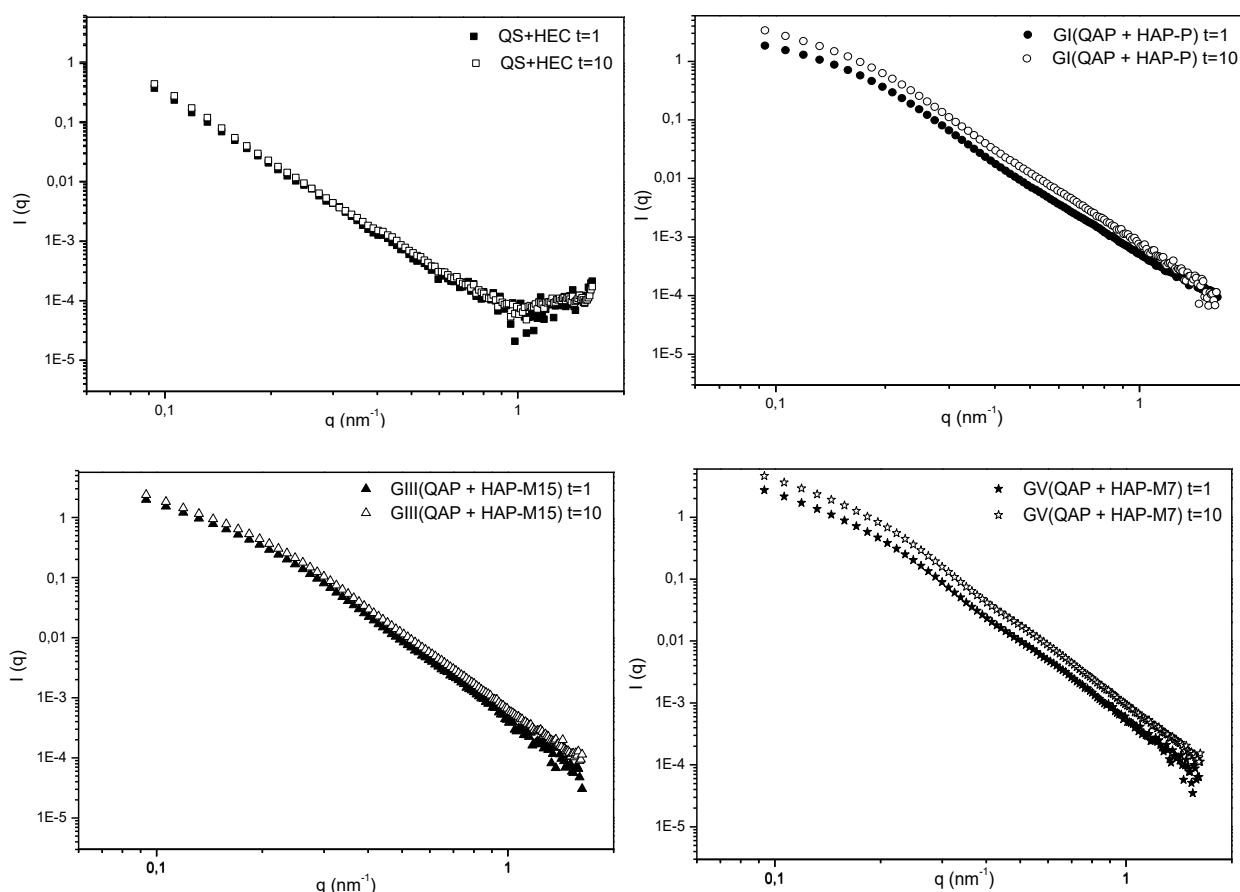


Figura IV.23. Curvas de SAXS para os compósitos e sua matriz polimérica durante 10 min de liofilização ($t=1$ s e $t=10$ min).

Como pode ser observado, as curvas referentes ao arcabouço polimérico (QAP+HEC) não apresentaram alterações significativas, o que indica que poucas mudanças conformacionais ocorreram na estrutura da matriz durante o processo de secagem sob vácuo e em baixas temperaturas. Geralmente, o perfil de espalhamento de algumas soluções poliméricas mostra-se como estado de recuperação de forma anômalo a baixos valores de q , quando estas dispersões estão na fase líquida. Este efeito é conhecido como efeito “Picot-Benoit” (VENTURA, PELED, 2015), e implica em menor flexibilidade nas alterações estruturais.

A quitosana é um polieletrólito ao qual protona-se em ambientes ácidos, o que altera sua conformação de rede, tornando-se uma malha definida e rígida (VENTURA, PELED, 2015). Às vezes, nem todo o polímero dispersa facilmente na solução, levando

a presença de aglomerados o que altera a sua turbidez. Contudo, estas estruturas relativamente grandes não são detectados nestas medidas de SAXS, pois estariam a valores muito a baixo q (VENTURA, PELED, 2015).

Os polissacarídeos, tal qual a quitosana, estruturam-se durante a transição sol-gel ainda na fase líquida. A formação em rede dá-se através das ligações de hidrogênio, principalmente, e é favorecida pelas baixas temperaturas de congelamento, e mantidas mesmo após a liofilização. Mudanças na composição da dispersão de quitosana, seja ela pela simples adição de uma carga extra (p.ex. HAP), transformam o perfil desta rede, pois alteram as ligações entre as cadeias poliméricas. As ligações antes existentes apenas entre agregados de polímeros, são formadas, agora, por estes e os íons das partículas adicionais.

O tipo de interação ocorrida dependerá da disponibilidade de íons de cargas opostas, como ocorre nos compósitos estudados. Logo, esta heterogeneidade de ligações e composições levaram a uma inclinação das curvas de SAXS no intervalo de $0,22 < q(l) < 0,66$ para os compósitos, diferente do perfil da matriz. Por outro lado, ao contrário do observado nas curvas de SAXS para o quitosana, o deslocamento para altos valores de q ao longo do processo de secagem tornou-se mais pronunciado. O que já era esperado, visto que as partículas de hidroxiapatita presentes contribuiriam significativamente para a construção do perfil nas curvas de SAXS, e mostraram-se claros a contribuição na estruturação do compósito.

A substituição de moléculas de solvente por ar nos canais formado ao longo da estrutura do arcabouço, juntamente com a presença da HAP, contribuíram para o deslocamento para altos valores de q e alterações mínimas nos perfis da curva.

As partículas presentes alteraram o formato da curva, principalmente na região a baixos ângulos (menores valores de q), região que se caracteriza por partículas ou aglomerados. Provavelmente, associado a uma maior interconectividade e dispersão das partículas. As regiões centrais das curvas, posições e formas, definem a

contribuição do polímero sobre os compósitos, devido a permanência quase inalterada a incorporação da HAP.

Mudanças no perfil das curvas também são observados no produto final da liofilização, os arcabouços. Estas alterações podem estar associadas a presença de domínios fractais resultado da formação da estrutura do arcabouço após a liofilização. A Figura IV.24 representa as curvas de espalhamento para os arcabouços.

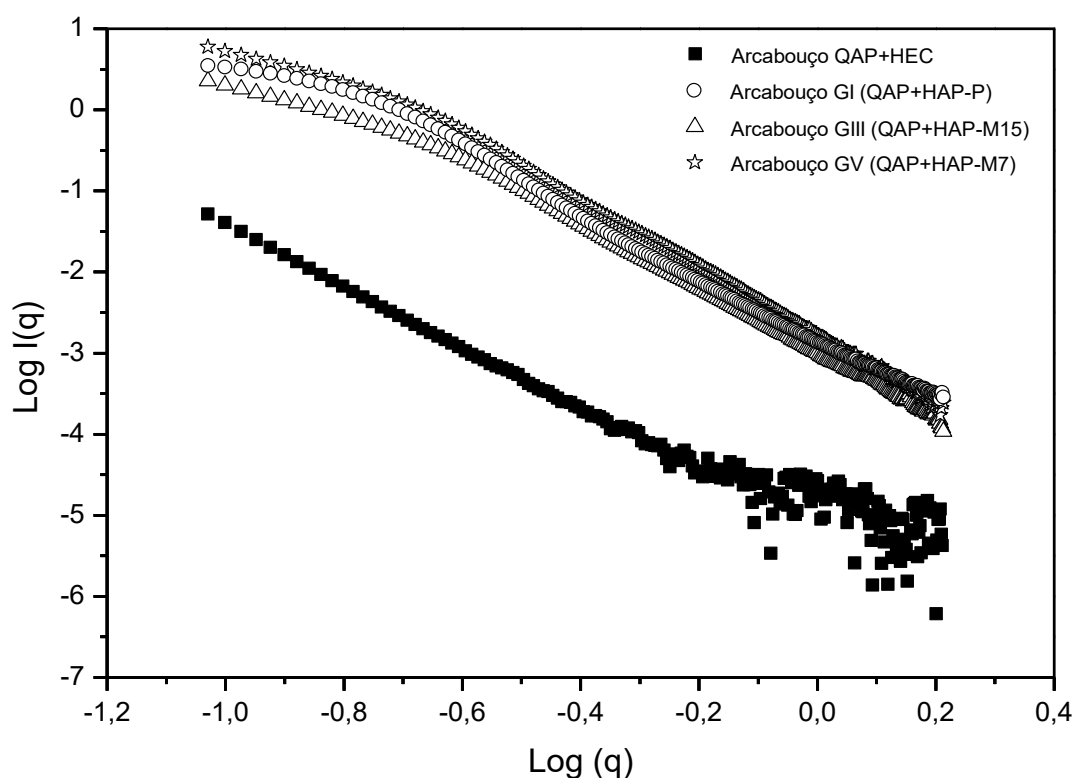


Figura IV.24. Curvas de SAXS para os arcabouços dos compósitos e sua matriz polimérica.

A indicação dos arcabouços como sendo massa ou superfície fractal dá-se pelo expoente D obtido do ajuste das curvas de SAXS $\text{Log } I(q) \times \text{Log } (q)$ para cada inclinação da curva da porção linear. Quando os domínios D estiverem entre -1 e -3, diz-se que o domínio é de característica de massa fractal (D_m), ou seja, pertencente a um sistema cuja massa é proporcional à área superficial. Se o D estiver entre -3 e -4, o domínio é

de superfície fractal (D_s) então, o sistema consiste em duas regiões não fractal separadas por uma superfície fractal. Estes dados estão expressos na Tabela IV.4.

Tabela IV.4. Parâmetros de massa e superfície fractal dos arcabouços.

ARCABOUÇOS						
GRUPOS	Intervalo de q	r^2	D	Intervalo de q	r^2	D
QAP+HEC	-1,02< q >-0,61	0,9999	-3,879	-0,61< q >0,21	0,8656	-2,673
GI (QAP + HAP-P)	-1,02< q >-0,61	0,9484	-2,149	-0,61< q >0,21	0,9960	-3,781
GIII (QAP + HAP-M15)	-1,02< q >-0,61	0,9920	-2,157	-0,61< q >0,21	0,9991	-3,959
GV (QAP + HAP-M7)	-1,02< q >-0,61	0,9886	-2,293	-0,61< q >0,21	0,9993	-4,192

Os ajustes aplicados no ajuste das curvas de SAXS apresentaram coeficientes de correlação (r^2) superior a 0,9, o que demonstra a dependência destas à relação $\text{Log } I(q) \times \text{Log } (q)$, também conhecida como lei de potência, para o primeiro intervalo analisado. Observa-se que, para o primeiro intervalo (a baixos valores de q , -1,02< q >-0,61), que o arcabouço polimérico, precursor dos compósitos, apresenta comportamento de superfície fractal, provavelmente, associado a um menor tamanho de poro e de partículas dispersas sob a estrutura, com D de -3,879. Uma redução no valor do domínio D ocorre após a adição da HAP, devido ao tamanho reduzido dos domínios de massa fractais, resultado da presença das partículas dispersas sob o polímero que alteraram os espaçamentos entre as cadeias poliméricas.

A inserção de partículas em um meio polimérico ocasiona alterações conformacionais do polímero. Como relatada anteriormente, estas mudanças conformacionais dependerão do tipo de interação estabelecida entre o polímero e a partícula.

A altos valores de q ($-0,61 < q < 0,21$), ocorre uma inversão do perfil das curvas com a redução dos domínios para valores inferiores a $-3,0$ resultado da alta agregação das partículas que não estabeleceram ligações químicas com o polímero. Os compósitos apresentaram característica de domínios de superfície fractal, o que pode resultar do aumento do número de agregados. Observa-se, contudo, que para o arcabouço polimérico o aumento do valor do domínio para $-2,673$, com valor de coeficiente de correlação menor do que $0,9$. Indicando alteração do domínio para massa fractal. O baixo r^2 indica que os dados não seguem, fidedignamente, a relação à lei de potência, correlacionado a alta dispersão das partículas a altos valores de q com aumento do ruído decorrido da baixa intensidade de espalhamento.

A presença do AE na composição dos arcabouços dos compósitos interferiu, como esperado, para alteração do perfil da curva e dos domínios fractais. A simples presença do AE levou a um ligeiro aumento do domínio de massa fractal, decorrente do aumento do tamanho da partícula. Contudo, o aumento da quantidade do AE, que levou a um aumento do tamanho da partícula, promoveu uma redução do domínio fractal, passando de $D_m = -2,93$ (GV) para $D_m = -2,157$ (GIII), o de menor concentração para o de maior concentração de AE.

IV.1.10. TOMOGRAFIA DE RAIOS X UTILIZANDO FONTES DE RADIAÇÃO SINCROTRON (TCRS).

As Figuras de IV.25 a IV.28 apresentam os volumes reconstruídos a partir das medidas de tomografia de raios X e as seções transversais destes mesmos volumes projetados nos eixos xy , xz e yz dos arcabouços poliméricos (QAP+HEC) e dos compósitos (GI, GIII e GV). É importante lembrar que a imagem por tomografia de raios X deste trabalho foram feitas no modo de absorção, ou seja, as projeções eram tomadas e o contraste da imagem indicava as regiões com diferentes coeficientes de absorção. Como os compósitos são formados por uma parte polimérica, composta basicamente

por elementos leves (H, C, O e N) e por HAP, que é um fosfato de cálcio, a absorção será maior onde a concentração de HAP for maior, por ser esta a componente do compósito com maior densidade eletrônica e portanto maior coeficiente de absorção de raios X. Para garantir uma maior estabilidade e a não deformação durante a rotação da amostra e assim obter as diversas projeções para a recomposição da imagem em 3D, as amostras foram colocadas em ponteiras. Assim, parte das imagens também contém as paredes das ponteiras de pipeta.

Observa-se a presença de canais no arcabouço polimérico formados pela reestruturação da matriz durante o congelamento e remoção do solvente. Estes canais possuem espaços quase regulares e de grandes dimensões. Após a expulsão do solvente, as cadeias poliméricas se reorganizam, precipitam e tornam-se mais resistentes. As extremidades apresentam-se desconectadas. Além dos canais tubulares observados, verifica-se a presença de microcanais. Esta alta porosidade advinda dos microcanais e dos canais tubulares dá a este compósito uma excelente capacidade de intumescimento.

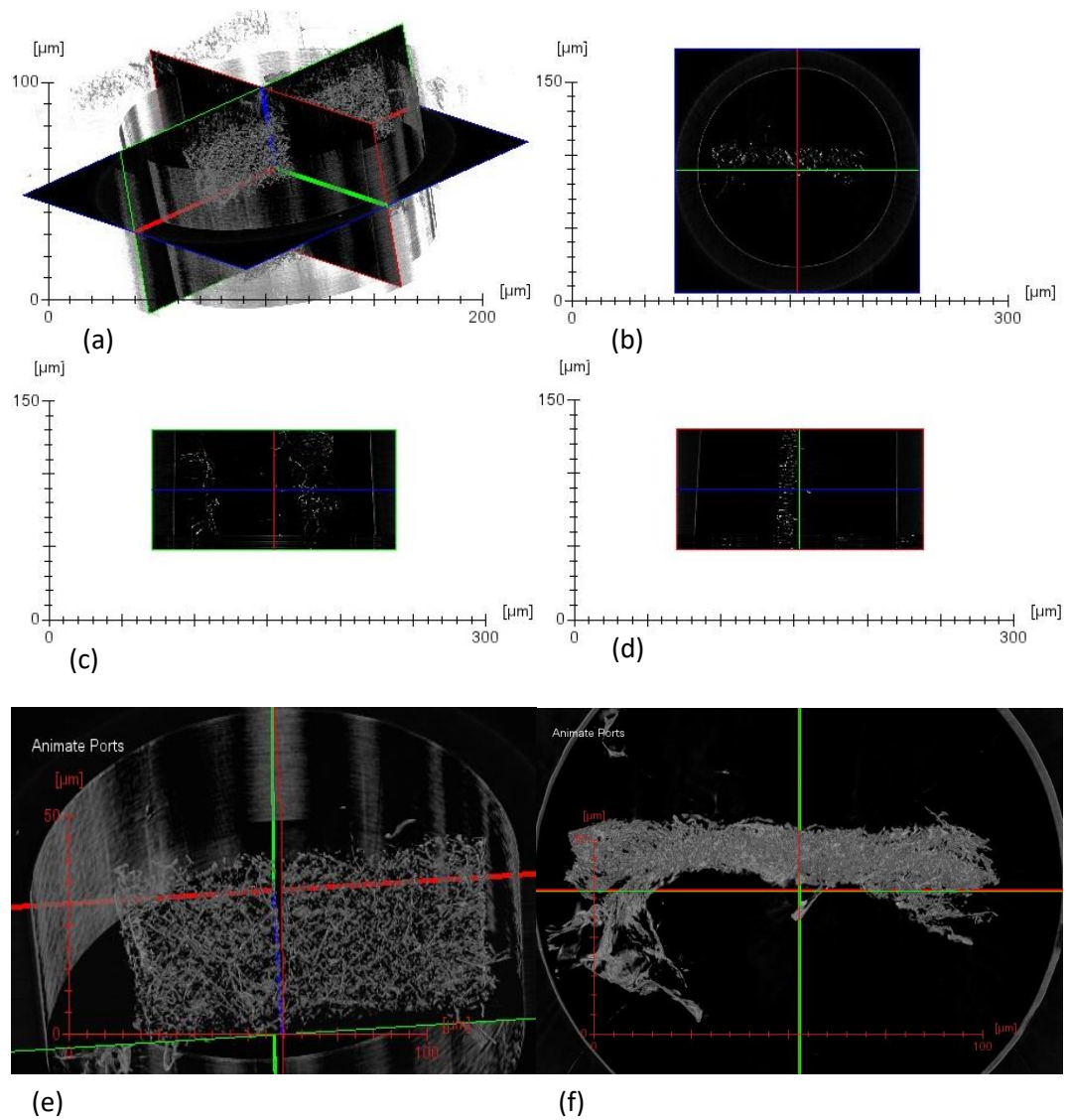


Figura IV.25. Imagens de tomografia de raios X do arcabouço polimérico (QAP+HEC): (a) seção completa, (b) projeção xy, (c) projeção xz, (d) projeção yz, (e) e (f) projeções com maiores ampliações.

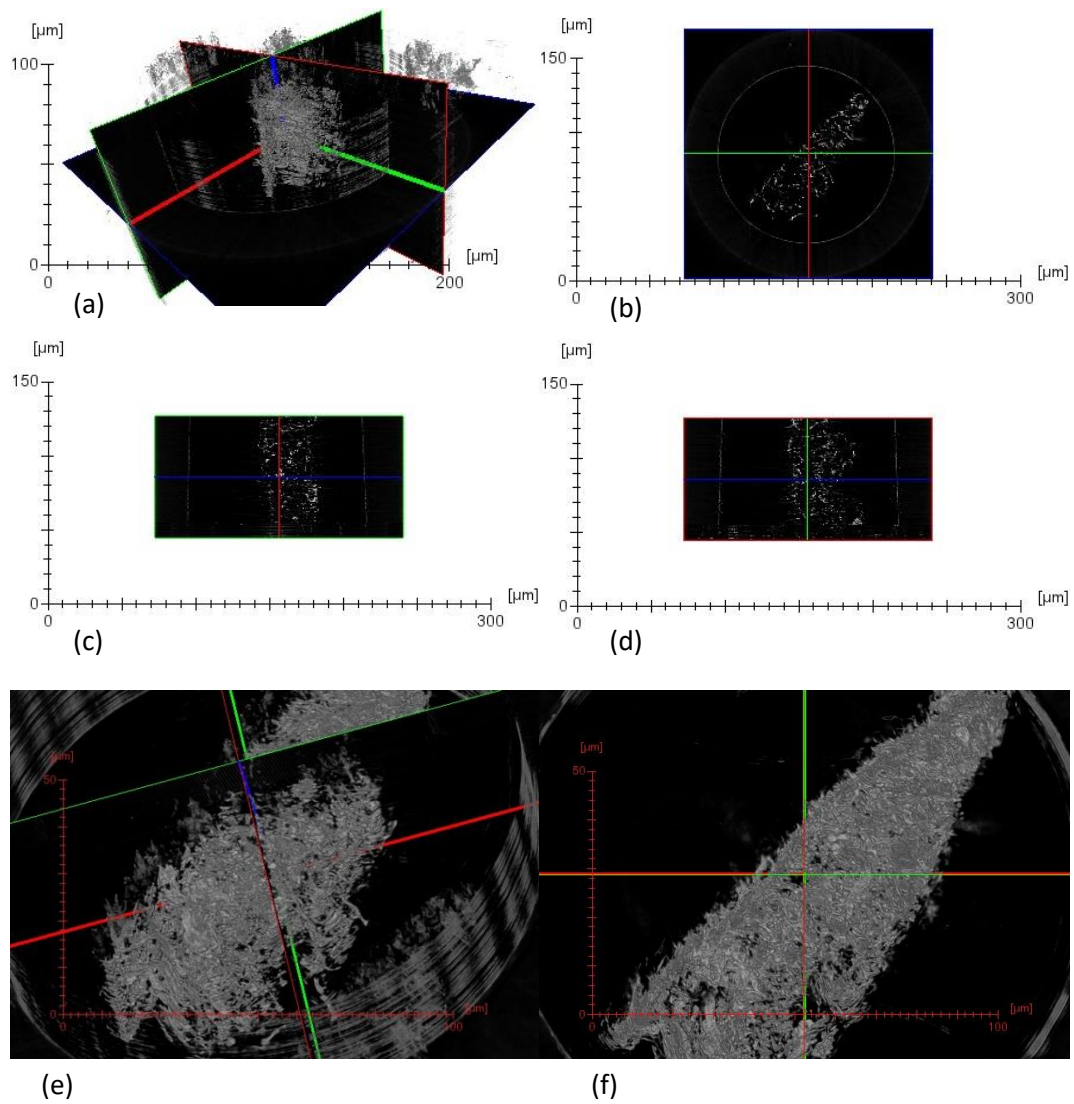


Figura IV.26. Imagens de tomografia de raios X do arcabouço GI (QAP + HAP-P): (a) seção completa, (b) projeção xy, (c) projeção xz, (d) projeção yz, (e) e (f) projeções com maiores ampliações.

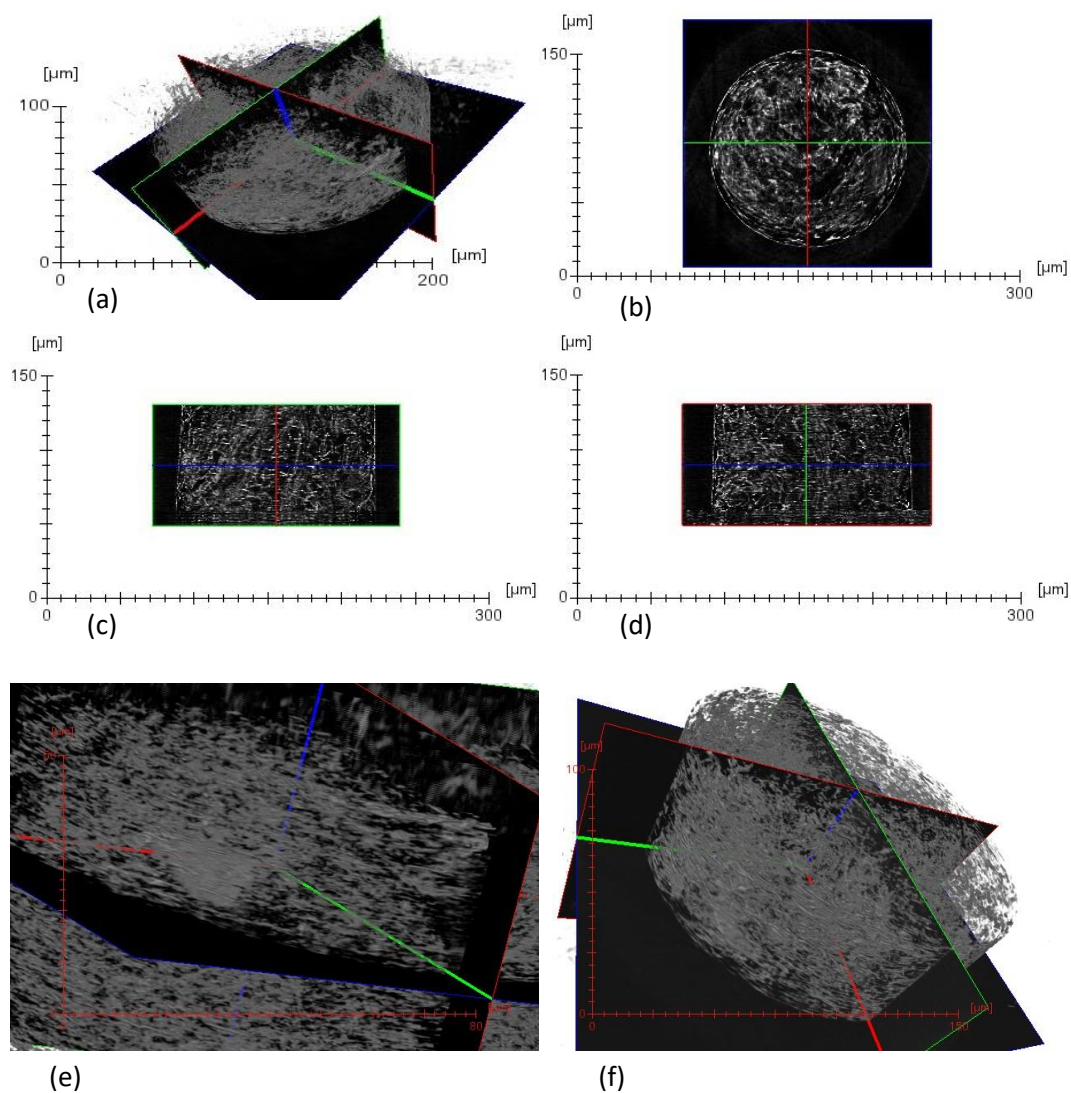


Figura IV.27. Imagens de Tomografia de raios X do arcabouço GIII (QAP + HAP-M15): (a) seção completa, (b) projeção xy, (c) projeção xz, (d) projeção yz, (e) e (f) projeções com maiores ampliações.

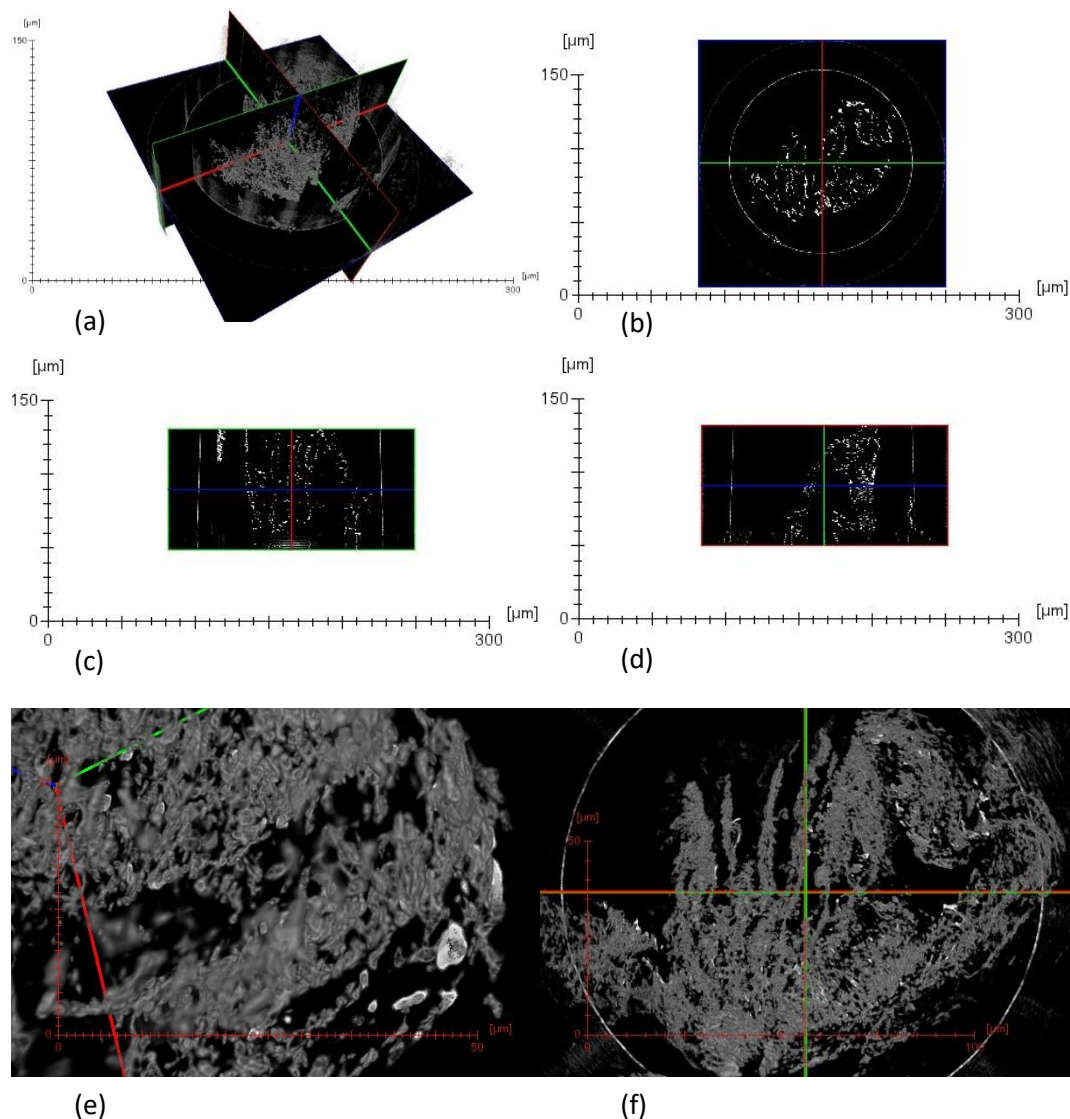


Figura IV.28. Imagens de Tomografia de raios X do arcabouço GV (QAP + HAP-M7): (a) seção completa, (b) projeção xy, (c) projeção xz, (d) projeção yz, (e) e (f) projeções com maiores ampliações.

As diferentes tonalidades do preto nas Figuras de IV.25 a IV.28, imagens (e) e (f), representa as diferentes densidades de absorção dos raios X. As regiões de maior densidade correspondem a partículas e hidroxiapatita. Átomos de maior peso molecular absorvem mais a radiação, sendo assim, os polímeros não são bons absorvedores, logo o maior contraste dará quando da presença da hidroxiapatita.

Como a interação entre a carga inorgânica e a matriz polimérica deste compósito ocorre através de interações superficiais, é notado uma maior distribuição de partículas

ao longo das fibras poliméricas. As partículas as quais não interagiram com o polímero, foram impregnadas nas fibras poliméricas, após a expulsão do solvente na sublimação.

As imagens representam a distribuição da carga inorgânica do compósito bioativo na matriz polimérica de QAP e HEC em uma seção transversal do compósito. Observa-se que esta distribuição não ocorreu de forma uniforme ao longo da matriz, concentrando-se maior parte das partículas ao centro. Isto pode estar associado a quantidade insuficiente do agente de viscosidade, o HEC, utilizado para melhorar a distribuição de cargas do hidrogel, ou as características físicas das nanocargas ao dispersarem-se nas fibras poliméricas.

As diferentes composições dos arcabouços bioativos interferiram significativamente na razão de distribuição aleatória das nanopartículas de HAP. Quando estas nanocargas encontraram-se modificadas superficialmente pelo AE, observou-se uma maior concentração de particulados depositados sobre as fibras poliméricas (ver Figuras IV.27 e IV.28), representados pelos pontos brancos nas imagens. Além de contribuir para uma dispersão regular e aleatória, a modificação de superfície da HAP em suas distintas concentrações proporcionou um maior acúmulo destas em regiões específicas do arcabouço. Nota-se que o arcabouço GIII (Figura IV.30), o qual é composto de 15% de AE, favoreceu a agregação de partículas, provavelmente, o aumento da proporção de AE contribuiu para este resultado.

Ao avaliar e estabelecer uma comparação entre os arcabouços com e sem HAP, percebe-se que as dimensões dos canais e a densificação do conteúdo orgânico/inorgânico apresenta distinções. Na ausência de HAP, a distribuição de canais e a uniformização das fibras poliméricas estão mais organizadas quando comparadas aos demais arcabouços. A HAP, então, promoveu alterações na estrutura tridimensionais do arcabouço devido as interações químicas entre seus constituintes.

A liofilização consiste em um processo de secagem de materiais, o qual baseia-se no congelamento da amostra seguido de sublimação dos solventes. Esta técnica garante a amostra a preservação de sua forma tridimensional adquirida durante o

congelamento. O solvente congelado é sublimado, e os espaços antes preenchidos por estes, tornam-se canais. As dimensões destes canais estão relacionadas a temperatura de congelamento e a sublimação (CAI, TONG, *et al.*, 2009).

Todo material disperso no solvente é aprisionado na estrutura congelada. Após a sublimação, estes agregados dispersos aderem a estruturas matriciais através de interações interfaciais. A QAP e a HAP, principais constituintes da matriz dos compósitos bioativos analisados, estabelecem entre si ligações intermoleculares iônicas através da interface entre suas superfícies. A HAP possui sítios de cálcio e fosfato em sua superfície que servem de pontos de interação com outros materiais. Com a quitosana, esta interação ocorre através de ligações entre os íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} e grupos hidroxilas e aminas (CAI, TONG, *et al.*, 2009; XIANMIAO, YUBAO, *et al.*, 2009).

É na fase de hidrogel que a HAP e a QAP estabelecem suas ligações. Durante o congelamento, ocorre a reestruturação da estrutura polimérica de quitosana através de sua precipitação. Tudo aderido à sua superfície é retido nesta estrutura.

IV.1.11. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (CITOTOXICIDADE)

A Figura IV.29 apresenta dados referentes ao efeito dos compósitos na viabilidade celular após 3 horas de incubação *in vitro* do MTT. Duas concentrações foram estudadas, 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$, para as quais os compósitos não apresentaram redução significativa da viabilidade celular quando comparados ao arcabouço polimérico, indicando assim, que não há redução mitocondrial suficiente do MTT para o azul de Formazan, sendo um indicativo indireto da ausência de efeito citotóxico para as concentrações estudadas. Quanto maior sua formação, maior será a toxicidade celular do material (SARAVANAN, NETHALA, *et al.*, 2011).

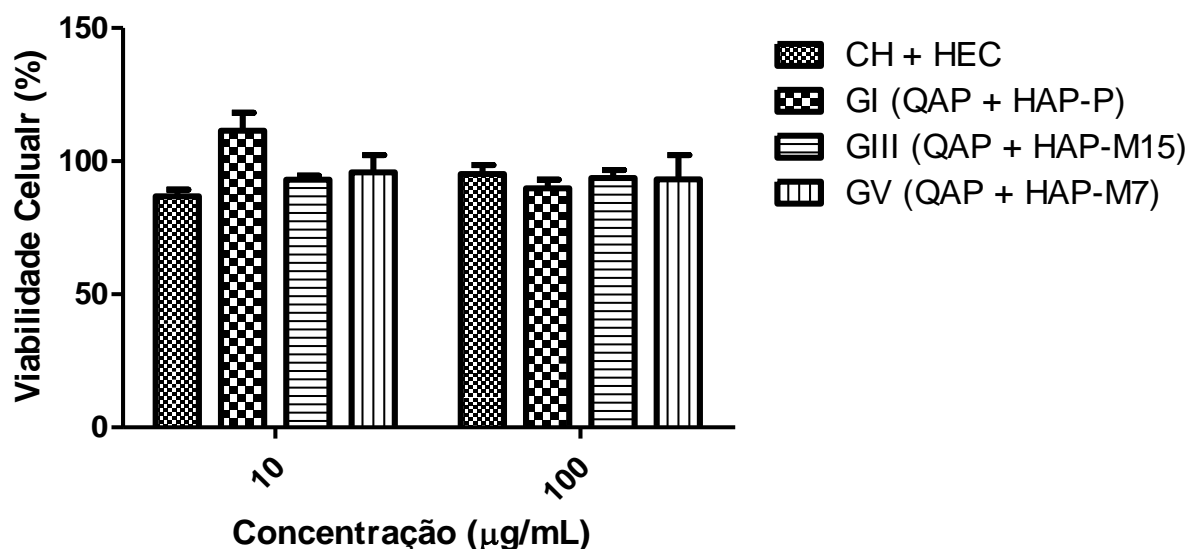


Figura IV.29. Efeito dos compósitos na viabilidade dos macrófagos usando o ensaio de MTT. As células foram tratadas com os compósitos (10 e 100 µg/mL) e expostas por 3 horas. Os dados foram expressos como % de células viáveis em comparação com o veículo e foram expressos com média e desvio padrão médio. Controle Positivo – células expostas ao meio de cultura (100% de viabilidade) e Controle Negativo – células expostas a 3% de Tween 20 (43,54% ± 3,90).

O aumento da viabilidade celular pode estar associado tanto a concentração usada como em função do tempo de experimentação. Observa-se na Figura IV.25 que a viabilidade do arcabouço polimérico aumentou em função da concentração (86,85% ± 2,51 para 95,21% ± 3,33, para as concentrações de 10 e 100 µg/mL, respectivamente). Estruturalmente, a quitosana é formada por um emaranhado de cadeias, quando processadas e dimensionadas em estruturas 3D, dão suporte a adesão, proliferação e diferenciação celular. Carregadas negativamente, as membranas celulares estabelecem interações eletrostáticas com grupos amino positivos da quitosana, protonadas após sua solubilização em meio ácido, constituindo uma conexão célula-polímero que favorece ao crescimento celular (WANG, LIU, *et al.*, 2010; BHARDWAJ,

KUNDU, 2011). BHARDWAJ, KUNDU, (2011) também consideraram o mesmo efeito ao avaliar blendas poliméricas constituídas de quitosana e fibroína, atribuindo a biocompatibilidade a interações de carga de superfície das membranas celulares (negativas) e da superfície da quitosana (positivas). SALCEDO, AGUZZI, *et al.* (2012) sugeriram que fatores de crescimento presentes no soro fetal poderiam contribuir para a adesão de células, além dos fatores relacionados a química de superfície da quitosana e a presença de cargas negativas na membrana das células.

A presença de partículas de HAP, com e sem modificação de superfície, não alterou significativamente a citocompatibilidade do arcabouço polimérico. Em ambas concentrações (10 e 100 µg/L), o efeito citotóxico permaneceu invariáveis (GIII: $93,00 \pm 1,60$ e $93,65 \pm 3,07$, e GV: $95,86 \pm 6,41$ e $93,24 \pm 9,03$, respectivamente 10 e 100 µg/L), exceto ao compósito GI ($110,4 \pm 6,78$ e $89,76 \pm 3,30$, respectivamente 10 e 100 µg/L). Para este compósito o aumento da concentração levou a uma redução da viabilidade celular. Após a imersão em fluido corporal simulado (SBF) e na presença de fatores de crescimento celular e nutrientes, a HAP inicia seu estágio de completa dissolução (ARIFIN, SULONG, *et al.*, 2014), disponibilizando ao meio íons cálcio e fosfatos, que em concentrações elevadas podem promover morte celular, além da perda da integridade mecânica do arcabouço. Isto pode ser uma justificativa a redução de viabilidade presenciada. Alguns autores associam esta redução a cristalinidade da cerâmica de fosfato de cálcio (PETER, GANESH, *et al.*, 2010). Quanto mais baixa for a sua cristalinidade, maior a solubilidade em meio corporal simulado, logo sua taxa de dissolução é maior, aumentando a disponibilidade destes íons em grandes quantidades de imediato. Por não estar recoberta por uma camada de AE, a disposição destes íons é maior para o compósito GI, formado a partir da HAP-P.

Segundo a GB/T 16886.5-2003 (ISO 10993-5: 1999), amostras com viabilidade celular maior que 75% são consideradas não citotóxicas (ARCHANA, SINGH, *et al.*, 2013), o que foi verificado para os compósitos desenvolvidos neste trabalho, os quais apresentaram valores superiores a 90%, sugerindo, portanto, a não citotoxicidade.

Logo, os ensaios de viabilidade celular permitiram avaliar os compósitos desenvolvidos e apontou que estes apresentaram uma boa compatibilidade com a cultura celular estudada. Permitindo assim, sugerir tais compósitos como potenciais candidatos a modelagem de biomateriais para lesões teciduais.

V. CONCLUSÕES

A precipitação por via úmida mostrou-se ser um procedimento técnico de obtenção de nanopartículas de hidroxiapatita prático e reprodutível, uma vez que o material cerâmico produzido correspondia ao fosfato de cálcio de interesse, tal como demonstrado pelos resultados apresentados de DRX, FTIR, TG/DTG, além da comprovação do tamanho nanométrico através da MEV e do EDL. Modificar a superfície da HAP pela inserção de AE foi a estratégia utilizada para conduzir uma melhor interatividade entre as partículas de HAP e os polímeros na formação do arcabouço. Mudanças nas características físicas e químicas das partículas inorgânicas sofreram alterações devido a modificação de superfície, tais como tamanho, morfologia, espectro de absorção no infravermelho e perfil de estabilidade térmica, entendidas como formação de novas estruturas a partir da interação com o AE. Entretanto, como esperado, alterações no difratograma não foram percebidas.

As quitosanas utilizadas tiveram seu GD comprovados através da titulação condutimétrica, os quais foram 63,49 e 95,25% para QBP e QAP, respectivamente. Esta diferença no grau de pureza refletiu no comportamento destes polímeros, observadas nas demais técnicas de caracterização, principalmente no que diz respeito a perdas de massa com a variação de temperatura.

A organização tridimensional dos arcabouços foi conseguida pela utilização da técnica de liofilização, que permitiu a criação de uma orientação das cavidades porosas, alongando-se do seu interior até a superfície. Para conseguir uma boa dispersibilidade das partículas de HAP sob o polímero, foi adicionada o HEC como agente de viscosidade na etapa que precedia o congelamento e liofilização.

A confirmação da formação do compósito baseou-se nas mudanças, mesmo que sutis, nas propriedades e características dos materiais sob a influência da composição. Pode-se inferir dos resultados que o AE permitiu leves estreitamento e mudanças de intensidade dos principais picos de difração da HAP após a formação do compósito. A

interação entre a HAP e a QAP/QBP foi percebida através do surgimento de algumas bandas e picos ao longo dos espectros no infravermelho dos compósitos, relacionados a interações de hidrogênio. A influência do AE na formação do compósito foi também notada quando picos relacionados a grupos cetônicos e carboxílicos surgiram com maior intensidade na razão de 15% de AE, levando então, a sugerir que um excesso de ácido graxo nestas amostras.

Os resultados da caracterização térmica, curvas de termogravimetria (TG) e sua derivada (DTG), permitiram sugerir algumas hipóteses sobre a mudança no perfil térmico das HAP-M, quando a HAP-P estava associada AE: que o AE em excesso poderia estar livre ou na sua forma amorfa. O aumento da quantidade de AE na composição da HAP nos compósitos alterou a quantidade de resíduos formados a cada faixa de decomposição térmicas. A pureza do polímero não modificou o perfil das curvas TG dos compósitos, mas sim seus valores em percentuais de perda.

O grau de porosidade das amostras permaneceu entre 71 e 90%, demonstrando que a metodologia de confecção dos compósitos origina estruturas extremamente porosas. A porosidade seguiu relação proporcional a composição, reduzindo com o aumento da concentração do AE. O intumescimento dos compósitos foi elevado e mostrou-se dependente da variação da composição dos grupos. O aumento da quantidade de AE levou a uma maior retenção da expansão do polímero e, consequentemente, a uma menor absorção. A partir das imagens de microscopia pode-se observar pequenos aglomerados aderidos a superfície polimérica, e que a distribuição não ocorreu de forma homogênea e igualitária, observando-se regiões com a ausência da biocerâmica.

A estruturação do arcabouço de compósito, originada no processo de expulsão do solvente, foi simulada e observada através do espalhamento de raios X a baixos ângulos, a qual possibilitou inferir que tal processo ocorria em dependência da composição do compósito. A modificação da superfície das nanopartículas de HAP

proporcionou perfis diferenciados de domínios fractais dependentes do tipo de interação estabelecida entre as partículas e os polímeros.

A influência do modificador de superfície da HAP na estruturação dos compósitos foi também notada na distribuição destas cargas inorgânicas ao longo do polímero. Após a expulsão do solvente, durante a liofilização, canais de tamanhos micrométricos foram formados e as partículas dispersas sedimentaram-se e impregnaram-se na cadeia polimérica, em um processo dependente da composição. A presença de cargas inorgânicas de HAP denotaram formação de poros mais desorganizados.

A indicação de compatibilidade biológica dos arcabouços de compósitos com uma cultura celular foi presumida pela não redução da viabilidade celular (MTT) nas concentrações avaliadas (10 e 100 µg/mL), independentemente de sua composição. O que sugere nenhum efeito citotóxico para os compósitos.

VI. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Reduzir a concentração do modificador de superfície sem perdas de propriedades;
- Propor alterações na modificação de superfície da HAP, como etapas adicionais que induzam a eliminação de excessos de AE;
- Utilizar um polímero (quitosana) de maior viscosidade com o intuito de eliminar a utilização de coadjuvantes de viscosidade;
- Avaliar a porosidade dos arcabouços utilizando a metodologia de adsorção/desorção sem aquecimento;
- Estudar a cinética de intumescimento dos arcabouços observando as alterações conformacionais através da tomografia de raios X;
- Discriminar as etapas que culminam na estruturação dos arcabouços de compósitos usando o espalhamento de raios X a baixos ângulos;
- Fazer ensaios complementares de viabilidade *in vitro* com outras culturas celulares;
- Ampliar os ensaios de compatibilidade biológica com ensaios de adesão celular.

REFERÊNCIAS

ALESSIO, R., NOGUEIRA, L.P., ALMEIDA, A. P., *et al.*, 2014, "Synchrotron radiation X-ray microtomography and histomorphometry for evaluation of chemotherapy effects in trabecular bone structure", In: *22nd International Congress on X-Ray Optics and Microanalysis Journal of Physics: Conference Series*, v. 499, pp. 1-7, 012019, Hamburg, Germany, Setembro, 2013.

ALMEIDA, A.P., SOARES, J., MENESES, A.A.M., *et al.*, 2012, "Phase contrast X-ray synchrotron imaging for assessing external and internal morphology of *Rhodnius prolixus*", *Applied Radiation and Isotopes*, v. 70, pp. 1340-1343.

ALMEIDA, E.D.P., COSTA, A.A., SERAFINI, M.R., *et al.*, 2012, "Preparation and characterization of chloroaluminum phthalocyanine-loaded solid lipid nanoparticles by thermal analysis and powder X-ray diffraction techniques", *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 108, pp. 191–196.

ALVES, E.A., GUIMARÃES, A.C.R., FIOCRUZ, *Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde*, v. 3, Cap 5: Cultivo celular, pp. 236. Disponível em: < http://www.epsv.fiocruz.br/upload/d/capitulo_5_vol2.pdf>, Acesso em: 01/07/2015.

ANDRADE, A.V.C., DA SILVA, J.C.Z., PAIVA-SANTOS, C.O., *et al.*, 2004, "Ceramic Engineering and Science Proceedings", *ICSD 151414*, v. 25, pp. 639-645.

ANGHELINA, F.V., BRATU, V., RUSANESCU, C.O., *et al.*, 2014, "Mathematical model of horizontal divergence contribution to the integrated intensity of single crystal diffraction in XRD analysis of materials", *Computational Materials Science*, v. 94, pp. 142–149.

ANTUNES, A.A.S. "Análise Térmica e determinação dos parâmetros cinéticos de preparações farmacêuticas e novas especialidades de zidovudina (AZT) " Tese (Doutorado - Programa de pós-graduação em Fármaco e Medicamento). Universidade de São Paulo. São Paulo. 2003. 259 p.

ARAUJO, S. S., SANTOS, M. I. S., DIAS, A. S., *et al.*, 2014, Chemical composition and cytotoxicity analysis of the essential oil from leaves of *Croton argyrophyllus* Kunth. *The Journal of Essential Oil Research*, v. 26, pp. 446-451.

ARCHANA, D., SINGH, B.K., DUTTA, J., *et al.*, 2013, "In vivo evaluation of chitosan–PVP–titanium dioxide nanocomposite as wound dressing material", *Carbohydrate Polymers*, v. 95, pp. 530– 539.

ARIFIN, A., SULONG, A.B., MUHAMAD, N., *et al.*, 2014, "Material processing of hydroxyapatite and titanium alloy (HA/Ti) composite as implant materials using powder metallurgy: A review", *Materials and Design*, v. 55, pp. 165–175.

ARMENTANO, I., DOTTORI, M., FORTUNATI, E., *et al.*, 2010, "Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review", *Polymer Degradation and Stability*, v. 95, pp. 2126-2146.

AZEVEDO, J.R., SIZILIO, R.H., BRITO, M.B., *et al.*, 2011, "Physical and chemical characterization insulin-loaded chitosan-TPP nanoparticles", *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 106, pp. 685-689.

BABAEI, Z., JAHANSHAHI, M., RABIEE, S.M., 2013, "The fabrication of nanocomposites via calcium phosphate formation on gelatin–chitosan network and the gelatin influence on the properties of biphasic composites", *Materials Science and Engineering C* v. 33, pp. 370–375.

BANDYOPADHYAY, J., MALWELA, T., RAY, S.S., 2012, "Study of change in dispersion and orientation of clay platelets in a polymer nanocomposite during tensile test by variostage small-angle X-ray scattering", *Polymer*, v. 53, pp. 1747-1759.

BARABÁS, R., CZIKÓ, M., DÉKÁNY, I., BIZO, L., *et al.*, 2013, "Comparative study of particle size analysis of hydroxyapatite-based nanomaterials", *Chemical Papers*, v. 67, p. 1414–1423.

BARDAJEEA, G.R., POURJAVADI, A., SOLEYMAN, R., 2011, "Novel nano-porous hydrogel as a carrier matrix for oral delivery of tetracycline hydrochloride", *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, v. 392, pp. 16– 24.

BAREIRO, O., SANTOS, L.A., 2014, "Tetraethylorthosilicate (TEOS) applied in the surface modification of hydroxyapatite to develop polydimethylsiloxane/hydroxyapatite composites", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 115, pp. 400–405.

BAYBAS, D., ULUSOY, U., 2012, "Polyacrylamide-hydroxyapatite composite: Preparation, characterization and adsorptive features for uranium and thorium", *Journal of Solid State Chemistry*, v. 194, pp.1-8.

BEIL, S., SCHAMBERGER, A., NAUMANN, W., *et al.*, 2012, "Determination of the degree of N-acetylation (DA) of chitin and chitosan in the presence of water by first derivative ATR FTIR spectroscopy", *Carbohydrate Polymers*, v.8, pp. 117–122.

BHARDWAJ, N., KUNDU, S.C., 2011, "Silk fibroin protein and chitosan polyelectrolyte complex porous scaffolds for tissue engineering applications", *Carbohydrate Polymers*, v. 85, pp. 325–333.

CAI, X., TONG, H., SHEN, X., *et al.*, 2009, "Preparation and characterization of homogeneous chitosan–polylactic acid/hydroxyapatite nanocomposite for bone tissue engineering and evaluation of its mechanical properties", *Acta Biomaterialia* v. 5, pp. 2693–2703.

CGEE. Materiais avançados no Brasil 2010-2022. Brasília: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2010.

CHAVAN, P.N., BAHIR, M.M., MENE, R.U., *et al.*, 2010, "Study of nanobiomaterial hydroxyapatite in simulated body fluid: Formation and growth of apatite". *Materials Science and Engineering B*, v. 168, pp. 224–230.

CHEN, B.H., CHEN, K.I., HO, M.L., *et al.*, 2009, "Synthesis of calcium phosphates and porous hydroxyapatite beads prepared by emulsion method", *Materials Chemistry and Physics*, v. 113, pp. 365–371.

CENGIZ, B., GOKCE, Y., YILDIZ, N., *et al.*, 2008, "Synthesis and Characterization of hydroxyapatite nanoparticles", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 322, pp. 29-33.

CROISIER, F., JÉRÔME, C., 2013, "Feature Article-Chitosan-based biomaterials for tissue engineering", *European Polymer Journal*, v. 49, pp. 780–792.

CZUBENKO, J.O., PIEROÓG, M., DRU"ZY'NSKA, M.G., 2013, "Water State in Chemically and Physically Crosslinked Chitosan Membranes", *Journal of applied polymer Science*, DOI: 10.1002/app.39357.

DIMZON, I.K.D., EBERT, J., KNEPPER, T.P., 2013, "The interaction of chitosan and olive oil: Effects of degree of deacetylation and degree of polymerization", *Carbohydrate Polymers*, v. 92, pp. 564– 570.

DONG, Y.D., BOYD, B.J., 2011, "Applications of X-ray scattering in pharmaceutical science", *International Journal of Pharmaceutics*, v. 417, pp. 101– 111.

DOU, X.C., ZHU, X.P., ZHOU, J., *et al.*, 2011, "Minocycline-released hydroxyapatite–gelatin nanocomposite and its cytocompatibility in vitro", *Biomedical Materials*, doi:10.1088/1748-6041/6/2/025002.

ELSABEE, M.Z., ABDOU, E.S., 2013, "Chitosan based edible films and coatings: A review", *Materials Science and Engineering C*, v. 33, pp. 1819–1841.

FANG, Z., FENG, Q., 2014, "Improved mechanical properties of hydroxyapatite whisker-reinforced poly(L-lactic acid) scaffold by surface modification of hydroxyapatite", *Materials Science and Engineering C*, v. 35, pp. 190–194.

FERESHTEH, Z., MALLAKPOUR, F., FATHI, M., *et al.*, 2015, "Surface modification of Mg-doped fluoridated hydroxyapatite nanoparticles using bioactive amino acids as the coupling agent for biomedical applications", *Ceramics International*, v. 41, pp. 10079–10086.

FLOREZ, N.R., TUNON, E.G., MUKADAM, Q., *et al.*, 2015, "An Investigation of the Mineral in Ductile and Brittle Cortical Mouse Bone", *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 30, pp. 786–795.

FU, Q., SAI, Z., RAHAMAN, M.N., *et al.*, 2013. "Toward Strong and Tough Glass and Ceramic Scaffolds for Bone Repair", *Advanced Functional Material*, v. 23, pp. 5461–5476.

FU, Z., SCHLIER, L., TRAVITZKY, N., *et al.*, 2013, "Rapid communication: Three-dimensional printing of SiSiC lattice truss structures", *Materials Science & Engineering A*, v. 560, pp. 851–85.

GAO, C., ZHUANG, J., LI, P., *et al.*, 2014, "Preparation of micro/nanometer-sized porous surface structure of calcium phosphate scaffolds and the influence on biocompatibility", *Journal of Materials Research*, v. 29, pp. 1144–1152.

GILANI, M.S., BOONE, M.N., MADER, K., *et al.*, 2014, "Synchrotron X-ray microtomography imaging and analysis of wood degraded by *Physisporinus vitreus* and *Xylaria longipes*", *Journal of Structural Biology*, v. 187, pp. 149-157.

GINEBRA, M.P., CANAL, C., ESPANOL, M., *et al.*, 2012, "Calcium phosphate cements as drug delivery materials", *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 64, pp.1090–1110.

GRAEWERT, M.A., SVERGUN, D.I., 2013, "Impact and progress in small and wide angle X-ray scattering (SAXS and WAXS)", *Current Opinion in Structural Biology*, v.23, pp. 748–754.

GUASTALDI, A.C., APARECIDA, A.H., 2010, "Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos", *Química Nova*, v.33, pp. 1352-1358.

HE, M., CHANG, C., PENG, N., *et al.*, 2012, "Structure and properties of hydroxyapatite/cellulose nanocomposite films", *Carbohydrate Polymers*, v. 87, pp. 2512-2518.

HOFMANN, S., HILBE, M., FAIARDO, R.J., *et al.*, 2013, "Research paper. Remodeling of tissue-engineered bone structures *in vivo*", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 85, pp. 119-129.

HOTZA, D., 1997, "REVIEW ARTICLE: Tape Casting", *Cerâmica*, v. 43, pp. 157-164.

HOUMARD, M., FU, Q., GENET, M., *et al.*, 2013, "On the structural, mechanical, and biodegradation properties of HA/b-TCP robocast Scaffolds", *Journal Of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials*, v. 101B, pp. 1233-1242.

HUNGER, P.M., DONIUS, A.E., WEGST, U.G.K., 2013, "Structure–property-processing correlations in freeze-cast composite scaffolds", *Acta Biomaterialia*, v. 9, pp. 6338–6348.

INEP. LAS: Laboratório Associado de Sensores e Materiais: O espectro infravermelho. Disponível em: < <http://www.las.inpe.br/~cesar/Infrared/espectro.htm>>. Acesso em: 10/11/2015.

IRASTORZA, R.M., CARLEVARO, C.M., VERICAT, F., 2013, "Medical Is there any information on micro-structure in microwave tomography of bone tissue?", *Engineering & Physics*, v. 35, pp. 1173–1180.

JANEGITZ, B.C., LOURENÇÃO, B.C., LUPETTI, K.O., *et al.*, 2007, "desenvolvimento de um método empregando quitosana para remoção de íons metálicos de águas residuárias" *Química Nova*, v. 30, n. 4, pp. 879-884.

JIN, H.H., KIM, D.H., KIM, T.W., *et al.*, 2012, "In vivo evaluation of porous hydroxyapatite/chitosan–alginate composite scaffolds for bone tissue engineering", *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 51, pp.1079– 1085.

KANGO, S., KALIA, S., CELLI, A., *et al.*, 2013, "Surface modification of inorganic nanoparticles for development of organic–inorganic nanocomposites—A review", *Progress in Polymer Science*, v. 38, pp. 1232– 1261.

KALITA, S.J., VERMA, S., 2010, "Nanocrystalline hydroxyapatite bioceramic using microwave radiation: Synthesis and characterization", *Materials Science and Engineering C*, v. 30, pp. 295–303.

KALYANI, S., SMITHA, B., SRIDHAR, S., *et al.*, 2006, "Blend membranes of sodium alginate and hydroxyethylcellulose for pervaporation-based enrichment of t-butyl alcohol", *Carbohydrate Polymers*, v. 64, pp. 425–432.

KUCHARSKA, M., BUTRUK, B., WALENKO, K., *et al.*, 2012, "Fabrication of in-situ foamed chitosan/b-TCP scaffolds for bone tissue engineering application", *Materials Letters*, v. 85, pp. 124–127.

KUMAR, G.S., GIRIJA, E.K., THAMIZHAVEL, A., *et al.*, 2010, "Synthesis and characterization of bioactive hydroxyapatite–calcite nanocomposite for biomedical applications", *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 349, pp. 56–62.

KUMAR, P.T.S., SRINIVASAN, S., LAKSHMANAN, V.K., *et al.*, 2011, "β-Chitin hydrogel/nano hydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications", *Carbohydrate Polymers*, v. 85, pp. 584–591.

LEE, W.H., LOO, C.Y., ROHANIZADEH, R., 2014, "Review-A review of chemical surface modification of bioceramics: Effects on protein adsorption and cellular response", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 122, pp. 823–834.

LEWANDOWSKA, K., SIONKOWSKA, A., GRABSKA, S., 2015, "Chitosan blends containing hyaluronic acid and collagen", *Compatibility behaviour*, v. 212, pp. 879–884.

LI, J., SUN, H., SUN, D., *et al.*, 2011, "Biomimetic multicomponent polysaccharide/nano-hydroxyapatite composites for bone tissue engineering", *Carbohydrate Polymers*, v. 85, pp. 885–894.

LI, Y., WENG, W., 2008, "Surface modification of hydroxyapatite by stearic acid: characterization and in vitro behaviors", *Journal of Materials Science: Materials medicals*, v. 19, pp. 19-25.

LIMA, T.A.R.M. *Propriedades estruturais e ópticas de nanomateriais biocompatíveis voltados para aplicação em filtros solares*. Dissertação, Programa de Pós-Graduação em Física - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

LIU, X., CHEN, Y., HUANG, Q., 2014, "A novel thermo-sensitive hydrogel based on thiolatedchitosan/hydroxyapatite/beta-glycerophosphate", *Carbohydrate Polymers*, v. 110, pp. 62–69.

LNLS. BRAZILIAN SYNCHRONOTRON LIGHT LABORATORY. "The 3D imaging beamline at LNLS". Disponível em: < <http://lnls.cnpm.br/blog/the-ir-microscope-of-lnls/>>. Acesso em 28/03/2014.

LOTYA, M., RAKOVICH, A., DONEGAN, J.F., *et al.*, 2013, "Measuring the lateral size of liquid-exfoliated nanosheets with dynamic light scattering", *Nanotechnology*, v. 24, pp. 1-6.

MALISKA, A.M., Microscopia Eletrônica de Varredura. Aula, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil. Acesso em: 30/10/2014.

MASCHIO, C., 1997, *Tomografia computadorizada de raios-X como técnica de ensaios não destrutivos de materiais*. Dissertação de M.Sc., Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.
MALVERN Instruments. Particle Size. Disponível em < http://www.malvern.com/en/?gclid=CMqqkq_Uxb8CFabm7AodMUcA4w>. Acesso em: 10/06/2014.

MIRONENKO, A., MODIN, E., SERGEEV, A., *et al.*, 2014, "Fabrication and optical properties of chitosan/Ag nanoparticles then film composites", *Chemical Engineering Journal*, v. 244, pp. 457-463.

MOHAMED, K.R., EL-RASHIDY, Z.M., SALAMA, A.A., 2011, "In vitro properties of nano-hydroxyapatite/chitosan biocomposites", *Ceramics International*, v. 37, pp. 3265–3271.

MOSMANN, T., 1983. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays", *Journal of Immunology Methods*, v. 65, pp. 55-63.

MUZZARELLI, R.A.A., 2011. "Review-Chitosan composites with inorganics, morphogenetic proteins and stem cells, for bone regeneration", *Carbohydrate Polymers*, v. 83, pp. 1433–1445.

NAKAHIRA, A., NISHIMURA, F., 2003, "Green Fabrication of Porous Ceramics Using an Aqueous Electrophoretic Deposition Process", *Communications of the American Ceramic Society*, v. 86, pp. 1230–32.

NELDAM, C.A., PINHOLT, E.M., 2014, "Synchrotron μ CT imaging of boné, titanium implants and bone substitutes – A systematic review of the literature", *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Sugery*, v. 45, pp. 801-805.

NESAMONY, J., SINGH, P.R., NADA, S.E., *et al.*, 2012, "Calcium Alginate Nanoparticles Synthesized Through a Novel Interfacial Cross-Linking Method as a Potential Protein Drug Delivery System", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 101, pp. 2177-2184.

NOGUEIRA, L.P., 2008, *Quantificação histomorfométrica óssea a partir de microtomografia 3D por contraste de fase e Transmissão de raios X utilizando Luz Síncrotron*, Dissertação de M.Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

NOGUEIRA, L.P., ALMEIDA, A.P., BRAZ, D., *et al.*, 2012, "Evaluation of rib microstructure in Wistar rats using SR- μ CT after radiation therapy simulation for breast cancer", *Applied Radiation and Isotopes*, v. 70, pp. 1296-1299.

NUNES, R. S., VALERIO, M. E. G, LIMA T.A.R.M.; LIMA, A. D., NASCIMENTO, N.S., LIRA, A. A. M. "Sistema lipídico nanoparticulado contendo nanopartículas de fosfatos de cálcio com superfície funcionalizada com ação fotoprotetora, processo para sua preparação e composições contendo o mesmo", 2011, Brasil. Número do registro: 036110000125, Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI110641601, data de depósito: 04/10/2011.

OBAIDA, R.M., BADER, A., AL-RAJAB, W., 2011, "Preparation of Mucoadhesive Oral Patches Containing Tetracycline Hydrochloride and Carvacrol for Treatment of Local Mouth Bacterial Infections and Candidiasis", *Scientia Pharmaceutica*, v. 79, pp. 197–212.

OJANEN, X., ISAKSSON, H. TÖYRÄS, J., *et al.*, 2015, "Relationships between tissue composition and viscoelastic properties in human trabecular bone", *Journal of Biomechanics*, v. 48, pp. 269–275.

OTHMANI, M., AISSA, A., BAC, C.G., *et al.*, 2013, "Surface modification of calcium hydroxyapatite by grafting of etidronic acid", *Applied Surface Science*, v. 274, pp. 151–157.

PACUREANU, A.J., 2013, "Imaging the bone cell network with nanoscale synchrotron computed tomography". Other. INSA de Lyon. English. <NNT: 2012ISAL0001>. Cap1.

PALUSZKIEWICZ, C., BLAZEWICZ, M., PODPORSKA, J., *et al.*, 2008. "Nucleation of hydroxyapatite layer on wollastonite material surface: FTIR studies", *Vibrational Spectroscopy*, v. 48, pp. 263-268.

PARK, J.H., LEE, D.W., IM, S.W., *et al.*, 2012, "Oxidative coupling of methane using non-stoichiometric lead hydroxyapatite catalyst mixtures", *Fuel*, v. 94, pp. 433–439.

PATHI, S.P., LIN, D.D.W., DORVEE, J.R., *et al.*, 2011, "Hydroxyapatite nanoparticle-containing scaffolds for the study of breast cancer bone metastasis", *Biomaterials*, v. 32, pp. 5112-5122.

PEIXOTO, J.A., *Desenvolvimento de Biomateriais micro e nanoestruturados baseados em compostos da família dos fosfatos de cálcio para aplicação em regeneração óssea e reconstituição dentária*. Dissertação, Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2011.

PENG, Y., LI, Y., 2014, "Combined effects of two kinds of essential oils on physical, mechanical and structural properties of chitosan films", *Food Hydrocolloids*, v. 36, pp. 287-293.

PETER, M., BINULAL, N.S., SOUMYA, S., *et al.*, 2010, "Nanocomposite scaffolds of bioactive glass ceramic nanoparticles disseminated chitosan matrix for tissue engineering applications", *Carbohydrate Polymers*, v. 79, pp. 284–289.

PETER, M., GANESH, N., SELVAMURUGAN, N., *et al.*, 2010, "Preparation and characterization of chitosan–gelatin/nanohydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications", *Carbohydrate Polymers*, v. 80, pp. 687–694.

PETOUKHOV, M.V., SVERGUN, D.I., 2013, "Review Applications of small-angle X-ray scattering to biomacromolecular solutions", *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 45, pp. 429– 437.

PIGHINELLI, L., KUCHARSKA, M., 2013, "Short Review: Chitosan–hydroxyapatite composites", *Carbohydrate Polymers*, v. 93, pp. 256-262.

PILLAI, C.K.S., PAUL, W., SHARMA, C.P., 2009. "Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation", *Progress in Polymer Science*, v.34, pp. 641–678.

PRZEKORA, A., PALKA, K., GINALSKA, G., 2014, "Chitosan/ β -1,3-glucan/calcium phosphate ceramics composites—Novel cell scaffolds for bone tissue engineering application", *Journal of Biotechnology*, v. 182–183, pp. 46–53.

RAMBO, C.R., SIEBER, H., 2005, "Novel synthetic route to biomorphic Al₂O₃ ceramics, *Advanced materials*, v.17, pp. 1088-1091.

REZNIKOV, N., CHASE, H., BRUMFELD, V., *et al.*, 2015, "The 3D structure of the collagen fibril network in human trabecular bone: Relation to trabecular organization", *Bone*, v. 71, pp. 189–195.

RHO, J.Y., SPEARING, L.K., ZIOUPOS, P., 1998, "Mechanical properties and the hierarchical structure of bone", *Medical Engineering & Physics*, v. 20, pp. 92–102.

ROWE, R.C., SHESKEY, P.J., QUINN, M.E., 2009, "Handbook of Pharmaceutical Excipients", In: *Pharmaceutical Press*, 6 ed., London and Chicago, UK and USA.

SAIZ, E., ZIMMERMANN, E.A., LEE, J.S., *et al.*, 2013, "Perspectives on the role of nanotechnology in bone tissue engineering", *Dental Materials*, v. 29, pp. 103–115.

SALCEDO, I., AGUZZI, C., SANDRI, G., *et al.*, 2012, "In vitro biocompatibility and mucoadhesion of montmorillonite chitosan nanocomposite: A new drug delivery", *Applied Clay Science*, v. 55, pp. 131–137.

SAMANTA, H.S., RAY, S.K., 2014, "Controlled release of tinidazole and theophylline from chitosan based composite hydrogels", *Carbohydrate Polymers*, v. 106, pp. 109–120.

SANZ, M.M., GIDLEY, M.J., GILBERT, E.P., 2015, "Application of X-ray and neutron small angle scattering techniques to study the hierarchical structure of plant cell walls: A review", *Carbohydrate Polymers*, v. 125, pp. 120–134.

- SARAVANAN, S., NETHALA, S., PATTNAIK, S., *et al.*, 2011, "Preparation, characterization and antimicrobial activity of a bio-composite scaffold containing chitosan/nano-hydroxyapatite/nano-silver for bone tissue engineering", *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 49, pp. 188–193.
- SCHOOOF, H., APEL, J., HESCHEL, I., *et al.*, 2001, "Control of Pore Structure and Size in Freeze-Dried Collagen Sponges", *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 32, pp. 352-357.
- SHIMOJO, A.A.M., PEREZ, A.G.M., RODRIGUES, A.A., *et al.*, 2012, "Preparação e caracterização de complexos polieletrólitos de ácido hialurônico-quitosana para aplicação como *scaffolds* do plasma rico em plaquetas", 7^oCOLAOB. 22-25 de agosto de 2012. Natal-RN-Brasil.
- SILVA, S.S., 2008, *Processing and surface modification of novel natural-origin architectures aimed for biomedical applications*, Tese de Doutorado, Universidade do Minho, Porto, Portugal.
- SILVERSTEIN, R.M., WEBSTER, F.X., KIEMLE, D.J., 2006, "Identificação espectrométrica de compostos orgânicos". 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, pp. 490.
- SON, J.S., APPLEFORD, M., ONG, J.L., *et al.*, 2011, "Porous hydroxyapatite scaffold with three-dimensional localized drug delivery system using biodegradable microspheres", *Journal of Controlled Release*, v. 153, pp. 133–140.
- STILLER, M., RACK, A., ZABLER, S., *et al.*, 2009, "Quantification of bone tissue regeneration employing beta-tricalcium phosphate by three-dimensional non-invasive synchrotron micro-tomography – A comparative examination with histomorphometry", *Bone*, v. 44, pp. 619-628.
- SUN, F., LIM, B.K., RYU, S.C., *et al.*, 2010, "Preparation of multi-layered film of hydroxyapatite and chitosan", *Materials Science and Engineering C*, v. 30, pp. 789–794.
- SWARBRICK, J., 2007, "Encyclopedia of Pharmaceutical Technology". In: *Informa healthcare*, 3 ed., v. 1, New York, USA, pp. 2021.
- SZUBERT, M., ADAMSKA, K., SZYBOWICZ, M., *et al.*, 2014, "The increase of apatite layer formation by the poly (3-hydroxybutyrate) surface modification of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate", *Materials Science and Engineering C*, v. 34, pp. 236–244.
- TAI, H.Y., FU, E., DON, T.M., 2012, "Calcium phosphates synthesized by reverse emulsion method for the preparation of chitosan composite membranes", *Carbohydrate Polymers*, v. 88, pp. 904– 911.

TANASE, C.E., POPA, M.I., VERESTIUC, L., 2011, "Biomimetic bone scaffolds based on chitosan and calcium phosphates", *Materials Letters*, v. 65, pp. 1681–1683.

TANEJA, K., PAREEK, A., VERMA, P., *et al.*, 2012, "Nanocomposite: An emerging tool for bone tissue transplantation and drug delivery", *Indian Journal of Transplantation*, v. 6, pp. 88-96.

THEIN-HAN, W.W., MISRA, R.D.K., 2009, "Biomimetic chitosan–nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering", *Acta Biomaterialia*, v. 5, pp. 1182–1197.

THEIN-HAN, W.W., SHAH, J., MISRA, R.D.K., 2009, "Superior in vitro biological response and mechanical properties of an implantable nanostructured biomaterial: Nanohydroxyapatite–silicone rubber composite", *Acta Biomaterialia*, v. 5, pp. 2668–2679.

UEBERSAX, L., APFEL, T., NUSS, K.M.R., 2013, "Biocompatibility and osteoconduction of macroporous silk fibroin implants in cortical defects in sheep", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 85, pp. 107–118.

UNIOSS. Banco de tecidos músculo esqueléticos. Disponível em: <<http://www.unioiss.com.br/pagina.aspx?id=343>>, Acesso em: 25/11/2015.

VENTURA, I., PELED, H. B., 2015, "Small-angle X-ray scattering study on pectin–chitosan mixed solutions and thermoreversible gels", *Carbohydrate Polymers*, v. 123, pp. 122–129.

VICTOR, S.P., SHARMA, C.P., SREENIVASAN, K., 2011, "Use of quartz crystal nanobalance to study the binding and stabilization of albumin and doxycycline on a thin layer of hydroxyapatite", *Applied Surface Science*, v. 258, pp. 1666– 1669.

VILELA, D.D. *Hidrogel de carboximetilcelulose de sódio e própolis: desenvolvimento e caracterização*. Dissertação, Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

WANG, X., LIU, B., REN, J., *et al.*, 2010, "Preparation and characterization of new quaternized carboxymethyl chitosan/rectorite nanonocomposite", *Nanonanocomposites Science and Technology*, v. 70, pp. 1161–1167.

WANG, X., XU, H., ZHAO, Y., *et al.*, 2012, "Poly(lactide-co-glycolide) encapsulated hydroxyapatite microspheres for sustained release of doxycycline", *Materials Science and Engineering B*, v. 177, pp. 367– 372.

WANG, W., STRECKER, S., LIU, Y., *et al.*, 2015, "Connective Tissue Growth Factor reporter mice label a subpopulation of mesenchymal progenitor cells that reside in the trabecular bone region", *Bone*, v. 71, pp. 76–88.

WEGST, U.G.K., BAI, H., SAIZ, E., *et al.*, 2015, "Bioinspired structural materials", *Nature Materials*, v. 14, pp. 23-36.

WILSON JR., O.C., HULL, J.R., 2008, "Surface modification of nanophases hydroxyapatite with chitosan", *Materials Science and Engineering C*, v. 28, pp. 434-437.

XIANMIAO, C., YUBAO, L., YI, Z., *et al.*, 2009, "Properties and in vitro biological evaluation of nano-hydroxyapatite/chitosan membranes for bone guided regeneration", *Materials Science and Engineering C*, v. 29, pp. 29-35.

ZELIG, U., MORDECHAI, S., SHUBINSKY, G., *et al.*, 2011, "Pre-screening and follow-up of childhood acute leukemia using biochemical infrared analysis of peripheral blood mononuclear cells", *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1810, pp. 827–835.

ZHANG, J., DAI, C.S., WEI, J., *et al.*, 2012, "Study on the bonding strength between calcium phosphate/chitosan composite coatings and a Mg alloy substrate", *Applied Surface Science*, v. 261, pp. 276– 286.

ZHANG, J., WANG, Q., WANG, A., 2010, "In situ generation of sodium alginate/hydroxyapatite nanocomposite beads as drug-controlled release matrices", *Acta Biomaterialia*, v. 6, pp. 445–454.

ZHANG, X., LI, Q., LI, L., *et al.*, 2012, "Fabrication of hydroxyapatite/stearic acid composite coating and corrosion behavior of coated magnesium alloy", *Materials Letters*, v. 88, pp. 76–78.

ZHANG, J., LIU, G., WU, Q., *et al.*, 2012, "Novel Mesoporous Hydroxyapatite/Chitosan Composite for Bone Repair", *Journal of Bionic Engineering* v. 9, pp. 243–251.

ZHOU, C., QI, W., LEWIS, E.N., *et al.*, 2015, "Concomitant Raman spectroscopy and dynamic light scattering for characterization of therapeutic proteins at high concentrations", *Analytical Biochemistry*, v. 472, pp.7–20.

ZHOU, H., LEE, J., 2011, "Review: Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering", *Acta Biomaterialia*, v. 7, pp. 2769–2781.

ANEXO – PRODUÇÃO CIENTÍFICA

ARTIGO

Gonsalves, J.K.M.C., Ferro, J.N.S., Barreto, E.O., *et al.*, 2016, “Influence of concentration of hydroxyapatite surface modifier agent on bioactive composite characteristics”, *Ceramics International*, v. 42, n. 15, pp. 17023–17031. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.07.210>

TRABALHOS EM CONGRESSOS

GONSALVES, J. K. M. C., NUNES, R. S., VALERIO, M. E. G. 2015. “Avaliação da concentração do agente modificador de superfície nas características da hidroxiapatita” 59° ABCeram.

GONSALVES, J. K. M. C., NUNES, R. S., VALERIO, M. E. G. 2015. “Investigação da influência da composição na estruturação de compósitos bioativos”. 59° ABCeram.

GONSALVES, J. K. M. C., FERRO, J. N. S., BARRETO, E. O., *et al.* 2014. “Avaliação da composição de compósitos bioativos na sua estrutura e atividade biológica”. PROMOB. CooperNano UFS-UFAL.